

**UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN**

**Facultad de Ciencias**

**Escuela Profesional de Biología – Microbiología**

Bioprospección de hongos celulolíticos aislados  
del proceso de compostaje en fase termófila

**TESIS**

**Presentada por:**

Bach. Jean Pierre Alan Quispe Mamani

**Para optar el Título Profesional de:**

**BIÓLOGO MICROBIÓLOGO**

TACNA - PERÚ

2025

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS DE PREGRADO N°424

En la ciudad de Tacna, en el Auditorium de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, siendo las 09:15 horas del día 13 de Setiembre del 2024, estando presente el jurado calificador nominado por Resolución de Facultad N°11033-2024-FACI-UN/JBG, conformado por los siguientes docentes:

DRA. SOLEDAD AMPARO BORNÁS ACOSTA	PRESIDENTA
DR. DALADIER MIGUEL CASTILLO COTRINA	SECRETARIO
DR. CARLOS FRANCISCO TITO VARGAS	VOCAL

Acto seguido, se dio lectura a la Resolución correspondiente y del mismo modo se dio lectura al Artículo 22 del Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias.

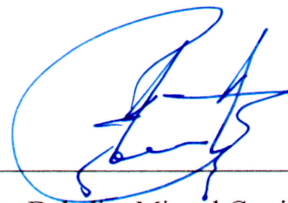
A continuación, el presidente del Jurado instó al Bachiller Jean Pierre Alan Quispe Mamani, a exponer la tesis titulada **“Bioprospección de hongos celulolíticos aislados del proceso de compostaje en fase termófila”**, para optar el título de profesional de Biólogo Microbiólogo.

Siendo las 10:00 horas, el tesista concluye su exposición, luego se procede a la formulación de las preguntas por parte de los miembros del jurado calificador. Terminado este proceso, se invitó a que los miembros del jurado emitan su calificación de acuerdo al reglamento. El promedio de la calificación dio el siguiente resultado: Aprobado por unanimidad con el calificativo de Bueno, nota 17, de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

Siendo las 11:00 horas, se dio por concluido el acto de sustentación de la tesis, firmando los señores miembros del jurado calificador, en señal de conformidad.



Dra. Soledad Amparo Bornás Acosta  
PRESIDENTA



Dr. Daladier Miguel Castillo Cotrina  
SECRETARIO



Dr. Carlos Francisco Tito Vargas  
VOCAL

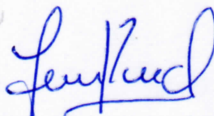
## CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Dr. Roberto Castellanos Cabrera, en mi condición de Asesor de la tesis de pregrado, declaro que el Bachiller Jean Pierre Alan Quispe Mamani (2009-34018), de la Escuela Profesional de Biología - Microbiología de la Facultad de Ciencias, sustentó la tesis titulada: **Bioprospección de hongos celulolíticos aislados del proceso de compostaje en fase termófila**, para obtener el Título Profesional de BIÓLOGO MICROBIÓLOGO. Habiendo cumplido con lo establecido en el Reglamento de la Facultad de Ciencias y considerando que según la revisión, evaluación y análisis realizado a través de Software TURNITIN, cuenta con el nivel de similitud permitido cuyo porcentaje fue del 6 %, por lo que, CERTIFICO que la tesis correspondiente está expedita para continuar con los trámites correspondientes para la obtención del título profesional y la publicación en el Repositorio Institucional.

Sin otro particular.

Atentamente.

  
\_\_\_\_\_  
**ASESOR**  
Dr. Roberto Castellanos Cabrera  
DNI: 00417795

  
\_\_\_\_\_  
**TESISTA**  
Jean Pierre Alan Quispe Mamani  
DNI: 47630441

## DEDICATORIA

Dedico el desarrollo de la presente tesis a Dios por cuidarme, darme fuerzas y haber puesto en mi camino por alguna razón a dos maravillosos seres: Sam y Dean, quienes me motivaron a seguir adelante brindándome soporte y compañía en los momentos más difíciles de soledad en los que me encontraba, permitiéndome superar los obstáculos para avanzar en mi formación y por confiar en mí a pesar de todo... ¡Gracias!

A mis padres y hermanas quienes con esfuerzo y sacrificio me brindaron el apoyo necesario para la culminación de mis estudios y así lograr obtener una carrera universitaria para mi futuro.

A mis compañeros cercanos que estuvieron conmigo en cada una de las etapas de mi vida y que me transmitieron sus ánimos a seguir aprendiendo y compartiendo el conocimiento generado.

## AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Biotecnología Enzimática de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohman que, a través del Proyecto de investigación financiado por los fondos canon, titulado “Aplicación de tecnología del ADN recombinante en la generación de cocteles enzimáticos para la biodegradación de residuo orgánico vegetal”, aprobado con la R.R. N°10979-2023-UNJBG y R.R. N°11174-2023-UNJBG; me proporcionó el espacio y los recursos necesarios para llevar a cabo los procedimientos experimentales esenciales para la realización de esta tesis.

Mi sincero agradecimiento al Dr. Roberto Castellanos Cabrera, mi asesor, por su apoyo, sus acertados consejos y sus enseñanzas. Su orientación y dedicación han sido una fuente constante de inspiración, guiándome a concluir este trabajo de investigación. Asimismo, a los investigadores Héber Esaú Ramírez Arua, Mirella Verónica Yllanes Huanacuni y Ana Julissa Naquiche Calero que confiaron en mí y a través de sus experiencias y conocimientos contribuyeron a mi desarrollo profesional. Su apoyo y amistad han sido fundamentales en las diversas etapas de ejecución de mi tesis. Estoy profundamente agradecido por su compañía y el valioso tiempo que compartieron conmigo.

Al Dr. Alonso Roberto Poma Ticona por sus consejos, comprensión y orientación en las etapas de redacción que fueron esenciales para la culminación de este trabajo.

## CONTENIDO

DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTOS .....	v
CONTENIDO .....	vi
ÍNDICE DE TABLAS .....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xv
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xvii
RESUMEN.....	xviii
ABSTRACT.....	xix
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO I. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....	2
1.1    Enunciado del problema.....	2
1.2    Definición y delimitación del problema .....	2
1.3    Características y significado del problema.....	3
1.4    Hipótesis.....	4
1.5    Objetivos.....	4
1.5.1    Objetivo general.....	4

1.5.2	Objetivos específicos .....	5
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO .....		6
2.1	Antecedentes de la investigación.....	6
2.1.1	Antecedentes internacionales .....	6
2.1.2	Antecedentes locales y nacionales .....	7
2.2	Fundamento teórico.....	10
2.2.1	El proceso de compostaje.....	10
2.2.2	Biomasa lignocelulósica.....	12
2.2.3	Biodegradación de celulosa por hongos.....	21
2.2.4	Celulasa.....	23
2.2.5	Producción de celulasas .....	25
2.2.6	Medición de actividad enzimática.....	29
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO .....		33
3.1	Tipo y diseño del estudio.....	33
3.1.1	Población y muestra .....	33
3.1.2	Diseños estadísticos de los experimentos .....	34
3.1.3	Operacionalización de variables .....	35
3.2	Materiales .....	36

3.2.1	Material de laboratorio .....	36
3.2.2	Material biológico .....	37
3.2.3	Reactivos .....	37
3.2.4	Equipos.....	38
3.3	Aislamiento de hongos filamentosos del compost .....	39
3.3.1	Cultivo monospórico.....	41
3.4	Selección cualitativa de hongos con capacidad celulolítica .....	42
3.4.1	Índice de hidrólisis enzimática de hongos .....	43
3.4.2	Influencia del pH en el crecimiento de hongos celulolíticos .....	44
3.4.3	Influencia de la temperatura en el crecimiento de hongos celulolíticos .....	45
3.4.4	Capacidad de crecimiento de los hongos celulolíticos.....	45
3.5	Identificación de cepa fúngica productora de celulasa.....	45
3.5.1	Caracterización macroscópica.....	46
3.5.2	Caracterización microscópica .....	47
3.5.3	Identificación molecular.....	47
3.5.3.1	Extracción de ADN genómico.....	48
3.5.3.2	Amplificación de productos por PCR.....	48

3.5.3.3	Procesamiento de secuencias y análisis bioinformático.....	49
3.6	Producción de celulasa fúngica utilizando residuo vegetal.....	50
3.6.1	Obtención del extracto crudo enzimático.....	53
3.6.2	Determinación de proteínas totales .....	53
3.6.3	Determinación de la actividad catalítica .....	54
3.6.4	Determinación de la actividad específica.....	56
3.6.5	Determinación del rendimiento.....	56
3.7	Caracterización de la enzima celulasa.....	57
3.7.1	Fraccionamiento por sulfato de amonio.....	57
3.7.2	Efecto del pH sobre la actividad celulasa .....	58
3.7.3	Efecto de la temperatura sobre la actividad celulasa .....	60
3.7.4	Termoestabilidad de la enzima celulasa.....	60
CAPÍTULO IV. RESULTADOS.....		62
4.1.	Aislamiento de hongos filamentosos del compost.....	62
4.2.	Selección cualitativa de hongos con capacidad celulolítica.....	66
4.2.1	Índice de hidrólisis enzimático de hongos .....	66
4.2.2	Influencia del pH en el crecimiento de hongos celulolíticos .....	72

4.2.3	Influencia de la temperatura en el crecimiento de hongos celulolíticos .....	76
4.2.4	Capacidad de crecimiento de los hongos celulolíticos.....	81
4.3.	Identificación de cepas fúngicas con mayor actividad celulolítica.....	85
4.3.1	Caracterización macroscópica.....	85
4.3.2	Caracterización microscópica .....	88
4.3.3	Identificación molecular.....	91
4.3.3.1	Extracción de ADN genómico.....	91
4.3.3.2	Amplificación de productos por PCR.....	91
4.3.3.3	Procesamiento de secuencias y análisis bioinformático.....	93
4.4	Producción de celulasa de la cepa FC-5 y FC-13.....	100
4.4.1	Determinación de proteínas totales .....	100
4.4.2	Determinación de la actividad catalítica .....	104
4.4.3	Determinación de la actividad específica.....	106
4.4.4	Determinación del rendimiento.....	109
4.5	Caracterización enzimática de celulasa de la cepa FC-5.....	111
4.5.1	Fraccionamiento por sulfato de amonio.....	111
4.5.2	Efecto del pH sobre la actividad celulasa .....	113

4.5.3	Efecto de la temperatura sobre la actividad celulasa .....	115
4.5.4	Termoestabilidad de la enzima celulasa.....	116
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN.....		118
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES .....		136
CAPÍTULO VII. RECOMENDACIONES.....		137
CAPÍTULO VIII. BIBLIOGRAFÍA.....		138
ANEXOS.....		163

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Contenido típico de diferentes residuos lignocelulósicos .....	14
<b>Tabla 2.</b> Enzimas comerciales provenientes de microorganismos.....	24
<b>Tabla 3.</b> Producción de celulasas por microorganismos celulolíticos.....	27
<b>Tabla 4.</b> Microorganismos y propiedades celulolíticas.....	28
<b>Tabla 5.</b> Métodos para la determinación de actividades enzimáticas. ....	32
<b>Tabla 6.</b> Operacionalización de las variables de estudio.....	36
<b>Tabla 7.</b> Ensayo para determinación de actividad enzimática de celulasas totales (FPU).....	55
<b>Tabla 8.</b> Índice de hidrólisis enzimático de hongos aislados del compost.....	69
<b>Tabla 9.</b> Influencia del pH en el crecimiento de hongos celulolíticos .....	73
<b>Tabla 10.</b> Influencia de la temperatura en el crecimiento de hongos celulolíticos .....	77
<b>Tabla 11.</b> Crecimiento radial de hongos celulolíticos aislados del compost.....	82
<b>Tabla 12.</b> Características macroscópicas de las cepas FC-5 y FC-13 .....	85
<b>Tabla 13.</b> Características microscópicas de las cepas FC-5 y FC-13.....	88
<b>Tabla 14.</b> Concentración y calidad del ADN extraído. ....	91
<b>Tabla 15.</b> Concentración y calidad de productos PCR.....	92
<b>Tabla 16.</b> Alineamiento local básico de la secuencia de la región ITS de la cepa FC-5.....	94

<b>Tabla 17.</b> Alineamiento local básico de la secuencia de la región ITS de la cepa FC-13.....	97
<b>Tabla 18.</b> Concentración de proteínas totales de ensayos fermentativos .....	101
<b>Tabla 19.</b> Cantidad de proteínas totales de ensayos fermentativos .....	102
<b>Tabla 20.</b> Actividad enzimática celulasa en ensayos fermentativos .....	104
<b>Tabla 21.</b> Actividad específica de ensayos fermentativos utilizando distintos sustratos.....	107
<b>Tabla 22.</b> Rendimiento de la producción por residuo vegetal utilizado.....	109
<b>Tabla 23.</b> Actividad enzimática celulasa en el fraccionamiento por sulfato de amonio.....	111
<b>Tabla 24.</b> Actividad enzimática a distintos pH .....	113
<b>Tabla 25.</b> Actividad enzimática a distintas temperaturas .....	115
<b>Tabla 26.</b> Actividad enzimática a distintas temperaturas y tiempo de exposición .....	117
<b>Tabla 27.</b> Diámetros de crecimiento de colonias en Agar con CMC .....	167
<b>Tabla 28.</b> Diámetros de crecimiento de colonias con halo en Agar con CMC ...	167
<b>Tabla 29.</b> Análisis de varianza para el Índice Enzimático .....	180
<b>Tabla 30.</b> Prueba de Duncan para los promedios de Índice Enzimático .....	180
<b>Tabla 31.</b> Análisis de varianza para influencia del pH en el crecimiento .....	181
<b>Tabla 32.</b> Prueba de Duncan para los promedios de biomasa a diferentes pH ...	181

<b>Tabla 33.</b> Análisis de varianza para influencia de la temperatura en el crecimiento .....	182
<b>Tabla 34.</b> Prueba de Duncan para los promedios de biomasa a diferentes temperaturas .....	182

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fases del proceso de compostaje .....	10
<b>Figura 2.</b> Composición estructural de la biomasa lignocelulósica .....	12
<b>Figura 3.</b> Estructura primaria de la celulosa tipo I .....	16
<b>Figura 4.</b> Estructura de la hemicelulosa .....	19
<b>Figura 5.</b> Estructura de las unidades fenilpropanoides precursoras de lignina .....	21
<b>Figura 6.</b> Conformación interna de cámara de Neubauer .....	52
<b>Figura 7.</b> Hongos aislados del compost en placas con PDA .....	63
<b>Figura 8.</b> Revelado de celulasas con rojo de congo 0,1 % .....	67
<b>Figura 9.</b> Índice enzimático de hongos aislados del compost .....	70
<b>Figura 10.</b> Influencia del pH en el crecimiento de hongos celulolíticos .....	74
<b>Figura 11.</b> Influencia de la temperatura en el crecimiento de hongos celulolíticos .....	79
<b>Figura 12.</b> Crecimiento de hongos celulolíticos .....	84
<b>Figura 13.</b> Fotografías del campo microscópico del hongo FC-5 .....	89
<b>Figura 14.</b> Fotografías del campo microscópico del hongo FC-13 .....	90
<b>Figura 15.</b> Fotografía de la corrida electroforética de los productos de PCR .....	92
<b>Figura 16.</b> Árbol filogenético por método de Máxima Verosimilitud de la cepa FC- 5 .....	95
<b>Figura 17.</b> Árbol filogenético por método de Máxima Verosimilitud de la cepa FC- 13 .....	99

<b>Figura 18.</b> Concentración de proteínas totales de ensayos fermentativos.....	103
<b>Figura 19.</b> Actividad catalítica de ensayos fermentativos utilizando distintos sustratos.....	105
<b>Figura 20.</b> Actividad específica de ensayos fermentativos utilizando distintos sustratos.....	108
<b>Figura 21.</b> Comparación del rendimiento de la producción de enzima celulasa.	110
<b>Figura 22.</b> Actividad enzimática del fraccionamiento por sulfato de amonio ....	112
<b>Figura 23.</b> Curva de pH de actividad enzimática celulasa .....	114
<b>Figura 24.</b> Curva de temperatura de actividad enzimática celulasa.....	116
<b>Figura 25.</b> Termoestabilidad de la celulasa.....	117
<b>Figura 26.</b> Crecimiento de hongos aislados del compost en Agar con CMC .....	166
<b>Figura 27.</b> Hongos aislados en medio extracto de levadura sacarosa (YES).....	168
<b>Figura 28.</b> Curva de calibración para reactivo Bradford (mg/mL).....	177
<b>Figura 29.</b> Curva de calibración para glucosa (mg/mL) .....	179
<b>Figura 30.</b> Curva de calibración para glucosa ( $\mu\text{mol/mL}$ ).....	179

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Características macroscópicas de los hongos aislados del compost ....	163
<b>Anexo 2.</b> Características microscópicas de los hongos aislados del compost .....	164
<b>Anexo 3.</b> Reactivación de cepas de hongos .....	165
<b>Anexo 4.</b> Crecimiento de hongos aislados del compost en agar CMC .....	166
<b>Anexo 5.</b> Hongos aislados en agar con extracto de levadura sacarosa .....	168
<b>Anexo 6.</b> Protocolo de extracción de ADN de hongos .....	172
<b>Anexo 7.</b> Ensayos de fermentación sumergida .....	174
<b>Anexo 8.</b> Recuperación de extractos crudos .....	175
<b>Anexo 9.</b> Curva de calibración para BSA .....	177
<b>Anexo 10.</b> Curva de calibración para la glucosa .....	178
<b>Anexo 11.</b> Análisis estadísticos .....	180
<b>Anexo 12.</b> Clave taxonómica utilizada para la identificación de la cepa FC-5 ...	183

## RESUMEN

En el presente estudio se tomaron muestras de material en proceso de compostaje de las plantas de la municipalidad Provincial de Tacna y del distrito de Ciudad Nueva, lográndose aislar ocho hongos de la fase termófila y mediante la realización de cultivos monospóricos se obtuvieron cepas puras. Los medios empleados para el crecimiento y caracterización de los hongos fueron agar papa dextrosa, agar extracto de malta, agar autolisado de levadura Czapek y agar sacarosa extracto de levadura. Mediante una selección cualitativa basada en el crecimiento en medio suplementado con carboximetilcelulosa (CMC), las cepas FC-5 y FC-13 fueron los mejores productores de enzimas celulasas según su alto índice enzimático. Estos 2 hongos se identificaron molecularmente mediante análisis de secuencias de la región ribosomal ITS, determinando a la cepa FC-5 dentro del género *Aspergillus* y a la cepa FC-13 dentro del género *Thermomyces*. En los experimentos de fermentación, se utilizaron diferentes residuos vegetales como sustratos, incluyendo mazorca de maíz, hojas de betarraga y hojas de perejil. Al emplear hojas de perejil molido como sustrato y utilizar la cepa FC-5, se obtuvo una actividad máxima de celulasa total de 0,121 U/mL en el extracto crudo. La celulasa de la cepa FC-5 fue estable durante una hora a la temperatura de 50°C, además la estabilidad se mantuvo hasta el 50% de la actividad máxima por 5 horas a la misma temperatura. La actividad enzimática máxima fue a pH 5 y su temperatura óptima de reacción fue de 60°C. Se concluye que la cepa FC-5 potencialmente podría ser utilizada en aplicaciones industriales.

**Palabras clave:** Compostaje, hongos celulolíticos, enzima celulasa, fermentación.

## ABSTRACT

In the present study, samples of material in the composting process were taken from the plants of the Provincial municipality of Tacna and the district of Ciudad Nueva, achieving the isolation of eight fungi of the thermophilic phase and by carrying out monosporic cultures, pure strains were obtained. The media used for the growth and characterization of the fungi were potato dextrose agar, malt extract agar, Czapek yeast autolysate agar and yeast extract sucrose agar. Through qualitative selection based on growth in medium supplemented with carboxymethylcellulose (CMC), strains FC-5 and FC-13 were the best producers of cellulase enzymes according to their high enzymatic index. These 2 fungi were molecularly identified through sequence analysis of the ITS ribosomal region, determining the FC-5 strain within the *Aspergillus* genus and the FC-13 strain within the *Thermomyces* genus. In the fermentation experiments, different plant residues were used as substrates, including corn cob, beet leaves, and parsley leaves. By using ground parsley leaves as a substrate and using the FC-5 strain, a maximum total cellulase activity of 0.121 U/mL was obtained in the crude extract. The cellulase of strain FC-5 was stable for one hour at a temperature of 50°C, and stability was maintained up to 50% of the maximum activity for 5 hours at the same temperature. The maximum enzymatic activity was at pH 5 and its optimal reaction temperature was 60°C. It is concluded that the FC-5 strain could potentially be used in industrial applications.

**Keywords:** Composting, cellulolytic fungi, cellulase enzyme, fermentation.

## INTRODUCCIÓN

La bioprospección de hongos celulolíticos representa un área de investigación de creciente interés en la búsqueda de soluciones sostenibles para la degradación de biomasa lignocelulósica; la mayoría del carbono renovable en nuestro planeta se encuentra en forma de lignocelulosa, que básicamente es una mezcla de celulosa, hemicelulosa y lignina. Cuando estas moléculas se descomponen, liberan azúcares fermentables que son esenciales para producir biocombustibles. El compostaje termófilo es un proceso natural que implica la descomposición microbiana de materiales orgánicos a altas temperaturas, y durante este proceso, los hongos celulolíticos juegan un papel crucial en la degradación de la celulosa. Por ello se explora la importancia de la bioprospección de estos hongos en la búsqueda de enzimas celulolíticas con potencial aplicativo en diversas industrias, desde la producción de biocombustibles hasta la industria alimentaria y de papel, destacando tanto su relevancia científica como su potencial impacto en la innovación tecnológica y la sostenibilidad ambiental. Comprender cómo la enzima interactúa con su sustrato; en este caso la celulosa, es fundamental para entender los mecanismos bioquímicos involucrados en la degradación de la celulosa y cómo se puede optimizar este proceso. Conocer las propiedades bioquímicas de la celulasa facilita la selección de las enzimas más eficientes para aplicaciones específicas. Además, la caracterización ayuda en la ingeniería de proteínas para mejorar las propiedades de la enzima, como su estabilidad, actividad y especificidad.

## **CAPÍTULO I**

### **PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

#### **1.1 Definición y delimitación del problema**

La tradición agrícola y forestal de nuestro país, permite disponer de grandes cantidades de residuos lignocelulósicos, como paja de cereales, bagazo de caña, residuos de poda, así como residuos vegetales sólidos municipales; una de las posibilidades de aprovechamiento de estos materiales consiste en su transformación vía hidrólisis enzimática, para obtener azúcares reductores fácilmente fermentables a etanol, butanol, ácido acético, acetona, ácido láctico, etc.

En el Perú existe pocos reportes sobre hongos filamentosos termófilos que participen en la degradación de la celulosa. Por este motivo, se plantea aislar y caracterizar hongos termófilos celulolíticos del compost que posean un alto rendimiento de celulasas, con la finalidad de producir enzimas termoestables como una alternativa ecológicamente amigable.

#### **1.2 Enunciado del problema**

Para la producción de enzimas de interés industrial por fermentación se requiere utilizar un sustrato de bajo o nulo precio para disminuir los costos de producción, así como el reconocimiento de los parámetros importantes que la afectan, tales como temperatura, pH, sustrato, aireación y agitación.

Este estudio tiene como propósito fundamental identificar y dar a conocer las características de la enzima celulasa producida por uno de los hongos que crecen en la fase termófila del proceso de compostaje.

El planteamiento del problema se formula de la siguiente manera: ¿Cuáles son las características bioprospectivas de la celulasa obtenida de un hongo celulolítico aislado del compost en fase termófila?

### **1.3 Características y significado del problema**

Actualmente, existe una gran inflación demográfica en el mundo y el resultado de diversas actividades desarrolladas en las ciudades ha conllevado a la acumulación de materia lignocelulósica como residuos problema (Arja, 2007). Los residuos lignocelulósicos son abundantes y baratos porque se originan de flujos de desechos.

La producción sostenible de etanol en el futuro es factible si las materias primas 2G (lignocelulosa) y 3G (algas) se utilizan como fuente principal de azúcares fermentables. Pero, su bioconversión a etanol con la tecnología existente no puede competir económicamente con las materias 1G, como la caña de azúcar y la remolacha azucarera (Sharada et al., 2014).

Existen procesos de producción de celulasas utilizando tecnologías modernas, sin embargo, aún se requiere buscar nuevas enzimas más robustas con

mejor actividad catalítica y estabilidad térmica. Además, el requerimiento de celulasas con estabilidad a elevadas temperaturas de reacción se justifica como una propiedad necesaria y ventajosa para la incorporación de pre-tratamientos del material lignocelulósico que aumentan la disponibilidad y el acceso hacia la celulosa (Mojsov, 2016).

En tal sentido, la presente investigación se centrará en describir las características bioprospectivas de la celulasa de los hongos aislados del compost en fase termófila.

#### **1.4 Hipótesis**

La celulasa obtenida de un hongo celulolítico aislado del compost en fase termófila presenta características bioprospectivas para aplicaciones industriales.

#### **1.5 Objetivos**

##### **1.5.1 Objetivo general**

Describir las características de bioprospección de hongos celulolíticos aislados del proceso de compostaje en la fase termófila.

### **1.5.2 Objetivos específicos**

- Aislar e identificar hongos celulolíticos del compost en fase termófila.
- Seleccionar cepas fúngicas con mayor producción de celulasa.
- Producir celulasa fúngica utilizando residuos vegetales.
- Caracterizar la celulasa fúngica para su bioprospección.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Antecedentes de la investigación

##### 2.1.1 Antecedentes internacionales

Se han realizado investigaciones sobre la búsqueda de celulasas del género *Aspergillus* mediante fermentación sumergida con diferentes residuos, por ejemplo, en la utilización de bagazo de caña de azúcar como sustrato se presentaron los valores de 4,2 U/g y 0,64 U/g de FPasa (actividad celulasa sobre papel filtro) y CMCasa (actividad celulasa sobre el CMC) respectivamente (Vásquez, 2013).

Otros estudios de bioprospección mencionan que el hongo *Talaromyces emersonii* fue estudiado para la producción de celulasas termoestables como endo  $\beta$ -glucanasa, celobiohidrolasa y FPasa termoestables a un pH 4,8 y 80 °C (Busk y Lange, 2013).

De forma similar, se encontró algunos hongos del género *Trichoderma*, para la producción de celulasas, como el caso de *T. reesei*; que produjo celulasas utilizando cáscara de soja 19,3 g/L mediante fermentación en estado sólido (Ellila et al., 2017). Estudios como los de Libardi et al., (2017); ofrecen como alternativa de producción a bajo costo, reducción del impacto ambiental, usando *Trichoderma harzianum*, donde se aumentó la producción en 1,41 y 1,14 veces de FPasa y CMCasa comparando un medio con aguas residuales y sintético.

Behnam et al., (2019) en estudios de bioprospección, se realizó la fermentación en estado sólido para la producción de celulasa utilizando salvado de trigo como sustrato y manipulando tres hongos filamentosos, *Mucor indicus*, *M. hiemalis* y *Rhizopus oryzae*; las actividades de celulasa más altas de *R. oryzae*, *M. indicus* y *M. hiemalis* fueron 281 U/g, 163 U/g y 188 U/g de salvado de trigo seco, respectivamente.

Lizarraga et al., (2020) estudiaron la producción de celulasa a partir de *Aspergillus niger*, aprovechando los residuos de café, en matraces de 250 mL que contenían 10 g de sustrato y 15 mL de agua destilada para fermentación en estado sólido (SSF) y 10 g de sustrato con 100 mL de medio para fermentación sumergida (SmF). En ambos casos se añadió 1 ml de inóculo y se incubó en un agitador rotatorio a 250 rpm durante 5 días a 5,5 de pH; se logró producir en 92,50 FPU/mL (mililitro de solución de enzima original sin diluir) en fermentación en estado sólido y 78,72 FPU/mL en fermentación sumergida.

### **2.1.2 Antecedentes locales y nacionales**

En Ramírez y Coha (2003) se aislaron cepas de hongos celulolíticos termófilos a partir de 71 muestras de compost, suelos y estiércol de la ciudad de Lima (Cieneguilla, Cañete, La Molina, Hipódromo de Monterrico). La especie más prevalente fue *Streptomyces* sp y se evaluó la actividad de celulasas en las cepas, resultando la cepa *Streptomyces* sp (7CMC10) la que mostró los mayores niveles

de actividad endoglucanasa, exoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa con valores de 20,14; 2,61 y 5,40 U/mg, respectivamente. También, Gutiérrez y Villena (2003), en el Laboratorio de la Universidad Agraria la Molina (Lima-Perú): demostraron que el uso de un soporte de crecimiento favorece la formación de biopelículas y la producción de celulasas de *Aspergillus* sp, siendo hasta un 40% mayor que en los cultivos fermentativos sin soporte de crecimiento y logrando un incremento del 55% en la productividad.

Recientemente se proporcionó una descripción completa del aislamiento y selección de hongos nativos del suelo del bosque primario Macuya (Pucallpa-Ucayali) como productores de celulasas obteniéndose 50 cepas fúngicas diferentes a las que se hizo selección cualitativa por la formación de halos hidrolíticos resultando sólo 11 cepas seleccionadas para luego ser evaluadas en cultivos líquidos con lactosa y celulosa microcristalina. Los cultivos con lactosa mostraron un perfil de actividad enzimática con tendencia creciente, en tres cepas la actividad celulasa total fue hasta diez veces más altas y 5 veces más para endoglucanasa, cuando se cultiva con lactosa en comparación con celulosa microcristalina. Asimismo, se logró determinar los géneros de *Aspergillus* y *Penicillium* como predominantes (Vega, 2020).

También se evaluó la actividad celulolítica de hongos aislados en los departamentos de Cajamarca, Lima, Junín y Huánuco. Los hongos fueron

sometidos a reactivación y evaluados empleando la técnica de difusión radial en agar Czapeck-carboximetilcelulosa para luego seleccionar cinco cepas determinando su capacidad celulolítica por el método de Somogyi-Nelson, dichas cepas fueron: SA 726 (*Paecilomyces* sp), SA 668 (*Paecilomyces* sp), SA 651 (*Paecilomyces* sp), SA 683 (*Fusarium* sp) y HN 566 (*Aspergillus* sp) con AE de 0,048; 0,042; 0,042; 0,080 y 0,048 U/mL respectivamente sugiriendo poder ser empleadas en procesos biotecnológicos para el tratamiento de efluentes (Llacza et al., 2021).

En otro estudio denominado “Aislamiento de microorganismos productores de celulasas alcalinas de aguas termales y suelos de bosques de Contamana” elaborado por Cortez (2015). Se empleó un medio de cultivo con carboximetilcelulosa (CMC) al 0,5% y xilosa al 0,5% como fuente de carbono a 40°C y pH 7,4 para el crecimiento de hongos. Tras la selección en placas con carboximetilcelulosa teñida con Rojo Congo al 0,1%; se seleccionaron 26 cepas por mostrar un mayor halo de hidrólisis en CMC, siendo 22 bacterias y 4 hongos.

En cuanto a la producción de biomasa, las cepas fúngicas LMB-HAC7 y LMB-HAC9 destacaron por su mayor crecimiento a 50°C. En términos de actividad enzimática de endoglucanasa, la cepa fúngica LMB-HAC9 mostró su mayor actividad a pH 7,4 con un promedio de 2,3 UI/mL a 60°C. La identificación molecular confirmó la presencia de los géneros *Aspergillus* para dichas cepas fúngicas con un alto grado de similitud del 99% (Cortez, 2015).

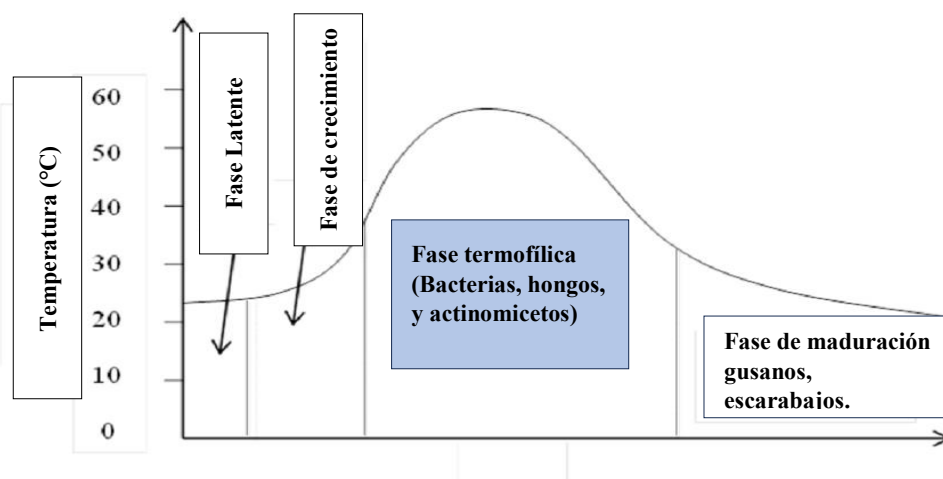
## 2.2 Fundamento teórico

### 2.2.1 El proceso de compostaje

El compostaje es un proceso de autocalentamiento en el que la actividad microbiana eleva la temperatura por encima de los 50 °C, seguido de un enfriamiento gradual al final del proceso (Antunes et al., 2016). Este procedimiento dinámico consta de tres etapas: mesófila, termófila y de maduración, como se observa en la Figura 1.

**Figura 1**

*Fases del proceso de compostaje*



*Nota.* Adaptado de “Sustainable Operation of Composting in Solid Waste Management”, por Vigneswaran et al., 2016, *Procedia Environmental Sciences* 35.

Los grupos microbianos mesófilos y termófilos se alternan para descomponer la materia orgánica según diferentes requisitos y tolerancias que se adaptan al entorno en constante cambio (Ryckeboer et al., 2003). En ese sentido, los procesos metabólicos microbianos son clave en la descomposición de moléculas resistentes que contienen carbono y nitrógeno, como la celulosa, lignocelulosa y proteínas presentes en la materia prima, generando un producto útil como fertilizante o acondicionador del suelo (Partanen et al., 2010).

Las especies de hongos se encuentran en el entorno natural en compost, sedimentos acuáticos, montones de heno, granos almacenados, montones de astillas de madera y otras acumulaciones de materia orgánica en las que las condiciones son cálidas, húmedas y aeróbicas, con una tolerancia de crecimiento en un rango mínimo de 20 °C y un máximo de 50 °C (Lee et al., 2014). Durante el proceso de compostaje, diversos materiales orgánicos se transforman en compuestos más simples de carbono y nitrógeno gracias a la actividad de microorganismos, especialmente hongos termófilos mediante la secreción de enzimas celulolíticas y xilanolíticas que facilitan la descomposición de la materia orgánica (Raut et al., 2008).

Las bacterias del género Actinobacteria y los hongos filamentosos termófilos, como *Aspergillus fumigatus*, son fundamentales en el proceso de compostaje. Se ha observado que estos microorganismos muestran un incremento en su desarrollo y producción de esporas cuando se exponen a temperaturas de hasta

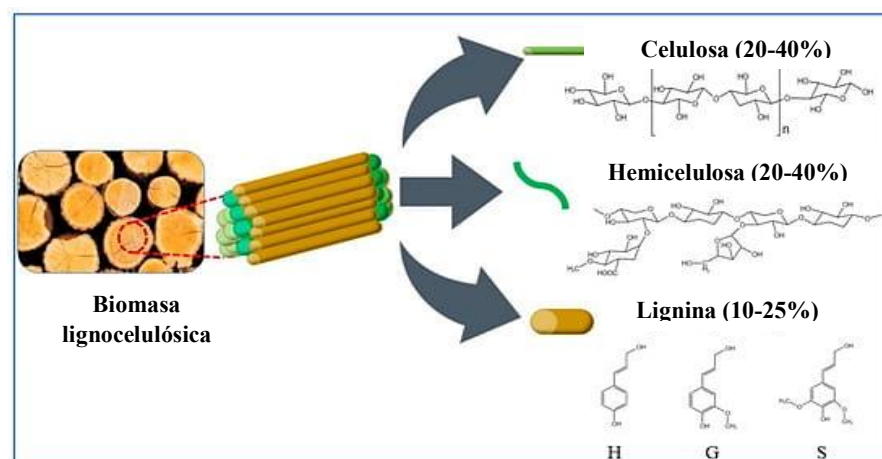
55 °C (Camacho et al., 2014). Su presencia activa contribuye de manera importante al compostaje al acelerar la descomposición de lignocelulosa.

### 2.2.2 Biomasa lignocelulósica

La materia lignocelulósica representa alrededor de la mitad de la biomasa actual en la Tierra, la composición química mayoritaria es de tres polímeros estructurales (Figura 2), la celulosa con 35 - 40%, la lignina con 15 - 35% y la hemicelulosa con 20 - 40% (Machado y Pereira, 2010).

**Figura 2**

*Composición estructural de la biomasa lignocelulósica*



*Nota.* Adaptado de “Hemicellulose-Based Polymers Processing and Application”, por Hu et al., 2020, *American Journal of Plant Sciences* 11(12).

Como la biomasa se produce en cantidades enormes, el desarrollo de procesos y productos que la utilicen como materia prima es una opción sustentable (Serna et al., 2011). La conversión de la lignocelulosa en azúcares fermentables implica tres etapas sucesivas: reducción de tamaño, pretratamiento o fraccionamiento, y finalmente, hidrólisis enzimática (Bonilla, 2020; Sharma et al., 2019). Por lo que uno de los principales desafíos radica en la necesidad de buscar nuevas enzimas celulasas con mejor actividad y estabilidad térmica (Sajith et al., 2016).

Lograr una hidrólisis eficiente de la biomasa lignocelulósica, ya sea mediante procesos ácidos o enzimáticos, seguida de una fermentación exitosa, representa un gran reto (Sharma et al., 2019). Aunque la hidrólisis ácida es eficaz y relativamente económica, conlleva un alto impacto ambiental y la generación de compuestos químicos que pueden inhibir a los microorganismos fermentadores. Por otro lado, la hidrólisis enzimática ofrece ventajas significativas y actualmente es objeto de investigaciones activas (Torres y Villegas, 2006).

La biomasa residual producida en procesos productivos de sectores forestal, agrícola e industrial (Tabla 1) pueden ser altamente aprovechables para obtener azúcares simples con múltiples aplicaciones, por ejemplo, la obtención de etanol por fermentación, obtención de carbohidratos prebióticos, probióticos y posbióticos (Jayasekara y Ratnayake, 2019).

Dentro de los residuos sólidos orgánicos existe la fracción orgánica vegetal (FOVRSM), la cual está compuesta por una serie de restos vegetales como cáscaras y desechos de alimentos (Torres y Villegas, 2006). La reducción de estos residuos permite la resolución de los problemas ambientales que ocasiona la acumulación de biomasa lignocelulósica (Reyes, 2011).

**Tabla 1**

*Contenido típico de diferentes residuos lignocelulósicos*

<b>Residuos</b>	<b>Celulosa (%)</b>	<b>Hemicelulosa (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>
Mazorcas de maíz	45	35	15
Cáscaras de frutos	25-30	25-30	30-40
Paja de trigo	30	50	15
Bagazo de caña	22	15	11
Hojas	15-20	80-95	-
Pastos	25-40	35-50	10-30
Papel periódico	40-55	25-40	18-30
Pulpa residuo	60-70	10-20	5-10
Desechos sólidos primarios	8-15	-	24-29

*Nota.* Adaptado de “Producción de enzimas celulolíticas a partir de cultivos de *Trichoderma* sp., con biomasa lignocelulósica”, Suesca (2012).

Estos residuos contienen gran cantidad de celulosa, hemicelulosa y lignina, las cuales son susceptibles de utilizarse como sustratos en el cultivo de hongos filamentosos productores de celulasas extracelulares que contribuirían en

aplicaciones industriales como la generación de azúcares fermentables para la producción de etanol (Arja, 2007).

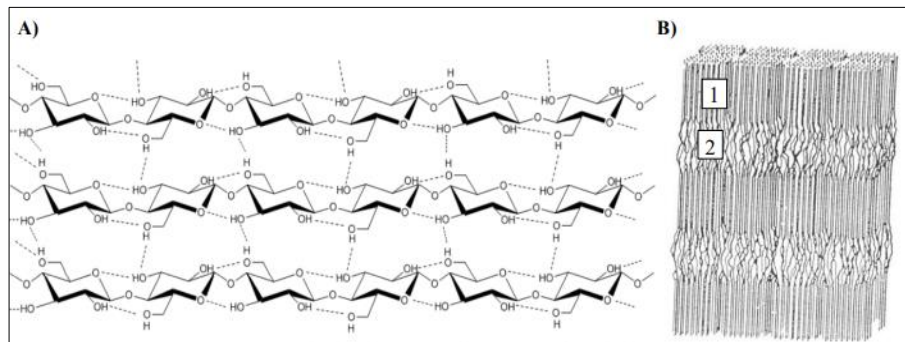
### ***Celulosa***

La celulosa es un polímero lineal, constituido por unidades de D-glucosa unidos mediante enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídico. En la naturaleza, la glucosa presenta una conformación más estable en forma típica de silla (Figura 3). Su peso molecular es desde 50 kDa a 2 500 kDa según su procedencia, que equivale de 300 a 15 000 unidades de glucosa por molécula de celulosa, respectivamente (Zhang et al., 2006).

Las moléculas de celulosa se encuentran unidas entre sí a través de puentes de hidrógeno y por fuerzas de Van Der Waals. Esta disposición le confiere a la fibra de celulosa su resistencia a los ataques físicos, químicos y enzimáticos (Gupta et al., 2019).

### Figura 3

#### *Estructura primaria de la celulosa tipo I*



*Nota.* Estructura de celulosa (A), microfibrilla de celulosa (B), región cristalina (1) y la región amorfa (2). Adaptado de “Concept of Structural Organization of Native Cellulose”, por Ioelovich, 1999, *Technological Advances. I*(1)

La celulosa constituye el principal componente de la pared celular de las plantas y también se encuentra en ciertas bacterias, protozoos y hongos filamentosos. Aunque no es soluble en agua, puede disolverse en soluciones de hidróxido de cobre amoniacal (Dávila y Vázquez, 2006). Además, es un componente muy común en la biomasa vegetal que puede ser descompuesto por diversos microorganismos, como los hongos filamentosos que liberan varias enzimas para este fin (Herrera et al., 2005). Estas enzimas han sido objeto de extensos estudios en hongos mesófilos como *Trichoderma reesei* (Ike y Ken, 2018).

La completa hidrólisis de la celulosa produce glucosa como producto final (Karmakar et al., 2011). Sin embargo, la actividad hidrolítica de las enzimas involucradas se ve afectada por factores físicos y químicos que restringen su uso a nivel industrial. Por lo tanto, es crucial identificar cepas que ofrezcan mejores rendimientos y que sean altamente estables ante condiciones extremas de pH, detergentes, solventes orgánicos, y capaces de mantener una óptima actividad enzimática a altas temperaturas de reacción (Sridevi et al., 2011). Por esta razón, los microorganismos termófilos se consideran una fuente atractiva para la producción de celulasas debido a su termoestabilidad y propiedades beneficiosas requeridas en aplicaciones industriales (Ramírez y Cocha, 2003).

En la descomposición de residuos orgánicos vegetales, desde la celulosa hasta la glucosa, intervienen tres tipos de enzimas clave: las endoglucanasas, las exoglucanasas y las  $\beta$ -glucosidasas. Las endoglucanasas actúan de manera aleatoria, rompiendo enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos dentro de la molécula de celulosa. Por otro lado, las exoglucanasas actúan de forma secuencial en los extremos reductores y no reductores del polisacárido, liberando glucosa o celobiosa, y finalmente, la celobiosa se convierte en glucosa mediante la acción de la  $\beta$ -glucosidasa al final del proceso de descomposición de este polímero (Halimah et al., 2019).

### ***Hemicelulosa***

La hemicelulosa es un grupo de polímeros compuestos por unidades de anhidro-azúcares unidas por enlaces glucosídicos. Su composición química varía según la planta de la que provienen, y presentan propiedades adhesivas, hinchables y dispersables en agua (Lincoln y Zeiger, 2006). Las hemicelulosas están compuestas por pentosanos como D-xilosa y L-arabinosa, y por hexosanos, como D-glucosa, D-manosa y D-galactosa. Además, las cadenas de hemicelulosa son mucho más cortas que las de celulosa (Fortes et al., 2010). Normalmente, las hemicelulosas no presentan estructura cristalina y sus cadenas son de forma variable entre diferentes especies de plantas (Soller et al., 2010).

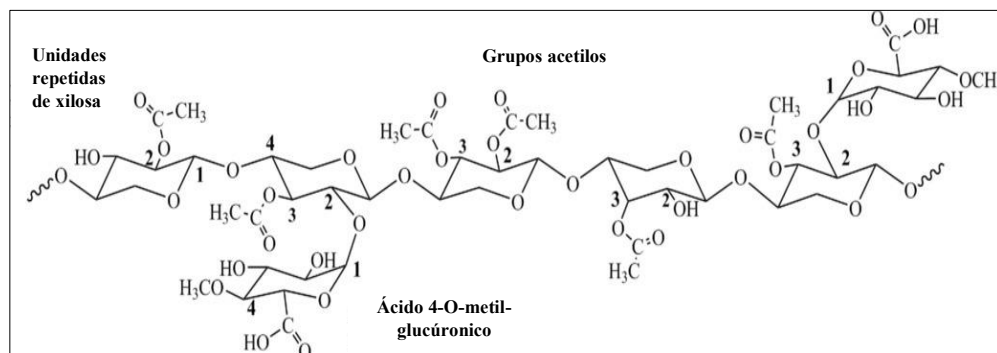
Las hemicelulosas se clasifican en dos grupos según su capacidad de hidrólisis y su composición química (Campbell y Reece, 2007). Los celulosanos consisten en azúcares simples que forman cadenas centrales de pentosas o hexosas con ramificaciones mínimas, siendo susceptibles al ataque de ácidos diluidos a altas temperaturas (Fortes et al., 2010).

Por otro lado, los poliuronidos presentan una cadena central de pentosas y hexosas, con ácidos hexurónicos laterales que contienen grupos metoxilo y acetilo libres (Figura 4). Estos son fácilmente hidrolizables por ácidos calientes y se unen a las ligninas mediante enlaces covalentes y puentes de hidrógeno, mostrando una asociación más débil con la celulosa (Lincoln y Zeiger, 2006).

Las enzimas involucradas en la biodegradación de la hemicelulosa son diversas y están adaptadas para descomponer los diferentes tipos de polímeros de azúcares que componen la hemicelulosa. Algunas de las enzimas clave incluyen: Xilanasas, que catalizan la hidrólisis de la xilosa, un componente importante de la hemicelulosa. Arabinanasas, que actúan sobre las arabinanasas, polímeros de arabinosa presentes en la hemicelulosa. Mananasas, galactanasas y acetil xilan esterases, que hidrolizan los grupos acetilo unidos a la xilosa, facilitando su degradación (Fortes et al., 2010).

#### Figura 4

##### *Estructura de la hemicelulosa*



*Nota.* Adaptado de “Hemicellulose-Based Polymers Processing and Application”, por Hu et al., 2020, *American Journal of Plant Sciences* 11(12).

## ***Lignina***

La lignina, un polímero de elevado peso molecular, presenta una estructura compuesta por unidades de fenilpropano y surge a través del acoplamiento combinatorio oxidativo de 4-hidroxifenilpropanoides, abarcando un amplio grupo de polímeros aromáticos. Los principales precursores de la lignina incluyen el alcohol trans-coniferílico (1), el alcohol trans-sinapílico (2) y el alcohol trans-*p*-cumarílico (3).

La composición de estos monómeros varía en cada planta; por ejemplo, en la madera de gimnospermas (maderas blandas), el alcohol más común es el coniferílico, mientras que en la madera de angiospermas (maderas duras) predomina el sinapílico, y en las plantas herbáceas, es el alcohol *p*-cumarílico (Rangel, 2012).

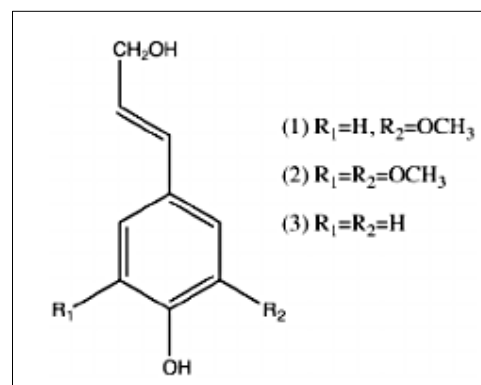
La biosíntesis de la lignina a partir de estos precursores se representa en la Figura 5, destacando la disposición aleatoria de las unidades de fenilpropano mediante enlaces C-O-C y C-C. En las paredes celulares, la lignina desempeña un papel crucial al actuar como un aglutinante que fusiona la hemicelulosa y la celulosa, confiriendo rigidez e impermeabilidad a las células (Hu et al., 2020).

En la biodegradación de la lignina están involucradas diversas enzimas que juegan roles específicos en su descomposición. Estas enzimas incluyen Ligninasas (Laccasas y Manganosas) las cuales son capaces de oxidar y modificar directamente los componentes de la lignina. Peroxidasas (como peroxidasas de manganeso y

lignina) actúan oxidativamente sobre los fenoles y otros compuestos ligninolíticos. Oxidasas fenólicas y no fenólicas catalizan la oxidación de los grupos funcionales fenólicos en la estructura de la lignina (Hu et al., 2020).

### Figura 5

*Estructura de las unidades fenilpropanoides precursoras de lignina*



*Nota.* Adaptado de “Hemicellulose-Based Polymers Processing and Application”, por Hu et al., 2020, *American Journal of Plant Sciences* 11(12).

### 2.2.3 Biodegradación de celulosa por hongos

Los hongos son conocidos por su capacidad de degradar la materia orgánica vegetal y producir una amplia variedad de enzimas esenciales para su crecimiento como saprófitos o patógenos (Herrera et al., 2005). El hongo *Trichoderma reesei* es un ejemplo notable de productor de celulasas, ampliamente utilizado a escala industrial (Lee et al., 2011). La aplicación de las celulasas implica la degradación

de residuos celulósicos y contribuye a la reducción de la contaminación ambiental (Srivastava et al., 2018).

El complejo celulasa de *Trichoderma reesei* muestra estabilidad frente a cambios abruptos de temperatura y a ciertos inhibidores químicos (Martínez et al., 2008). Se han observado situaciones de inactivación del complejo enzimático debido a una agitación excesiva que puede provocar la ruptura del micelio (Ovando y Waliszewski, 2005). Además, se ha señalado que la superficie de contacto entre la celulosa y el micelio afecta la hidrólisis, donde una menor superficie de contacto suele resultar en una mayor hidrólisis, debido a los fenómenos de adsorción entre la celulosa y el complejo celulasa (Sharada et al., 2014; Behnam et al., 2019).

La investigación de estos fenómenos ha sido significativa, ya que, paradójicamente, la adsorción es tan fuerte que conduce a la progresiva inactivación del complejo celulasa, manteniendo las enzimas unidas al sustrato o al producto de hidrólisis (Kannahi y Elangeswari, 2015). Además, se ha analizado el impacto del pH y la temperatura en los procesos de adsorción, observando una mayor adsorción a un pH de 4,8; donde se alcanza el máximo nivel de actividad enzimática. Por otro lado, el aumento de la temperatura reduce la tasa de adsorción entre la celulosa y el complejo celulasa, permitiendo la reversibilidad de los complejos enzima-sustrato y enzima-producto (Sohail et al., 2009).

A 50 °C, se observa una baja adsorción y coincide con la máxima actividad enzimática para *Trichoderma reesei*, lo que indica que a esta temperatura los

procesos de adsorción son mínimos. Sin embargo, a largo plazo, persiste la desactivación de enzimas del complejo celulolítico (Arévalo, 2011; Escudero et al., 2013).

En el mismo sentido, Emtiazi y colaboradores (2001), demostraron que *Aspergillus terreus* logró biodegradar heno y paja durante tres días, con una producción de biomasa en paja de 5g/L de peso seco a partir de 0,25 cm<sup>2</sup> de micelio inoculado, con una producción de 250 U/mL de CMCasa.

#### **2.2.4 Celulasa**

La celulasa es una enzima hidrolítica producida por hongos y bacterias, que desempeña un papel fundamental en la descomposición de la celulosa, que es la fuente de carbono más abundante en la Tierra (Mojsov, 2016).

##### ***Estructura de celulasas***

Las celulasas son proteínas complejas que constan de uno o más dominios catalíticos y, en muchos casos, también de dominios de unión a carbohidratos (CBM- Carbohydrate-Binding Modules). Los dominios catalíticos son responsables de la hidrólisis de los enlaces glucosídicos de la celulosa, mientras que los CBM ayudan a la enzima a unirse a la superficie de la celulosa, aumentando así su eficiencia (Mojsov, 2016).

### ***Mecanismos de acción***

Las celulasas se pueden clasificar en tres tipos principales según su mecanismo de acción: Endoglucanasas, actúan al azar sobre los enlaces glucosídicos internos de la celulosa amorfa, generando nuevos extremos de cadena. Exoglucanasas, se unen a los extremos de las cadenas de celulosa y liberan unidades de celobiosa (un disacárido de glucosa).  $\beta$ -glucosidasas, hidrolizan la celobiosa y los oligosacáridos solubles de glucosa, produciendo glucosa (Chaparro et al., 2009).

Las celulasas tienen una gran relevancia en la industria biotecnológica (Tabla 2) debido a su amplio espectro de aplicaciones en diversos sectores, como la industria textil, de alimentos, de biocombustibles, farmacéutica, entre otros. La producción de enzimas está mayormente influenciada por mecanismos como la inducción y la regulación nutricional metabólica, esto es, referido a la disponibilidad de carbono y/o nitrógeno (Zhang, 2013; Effiong et al., 2019).

**Tabla 2**

*Enzimas comerciales provenientes de microorganismos*

<b>Marca</b>	<b>Microorganismo y actividad enzimática</b>
Fungamyl® 800 L	$\alpha$ -amilasa (1,4- $\alpha$ -D-glucano-glucanohidrolasa) de <i>Aspergillus oryzae</i> solución acuosa, $\geq 800$ U/g
Carezyme 1000L®	Celulasa de <i>Aspergillus sp.</i> solución acuosa
Celluclast ® 1,5 L	Celulasa de solución acuosa de <i>Trichoderma reesei</i> $\geq 800$ U/g

*Adaptado de Ravindran et al., (2018).*

### 2.2.5 Producción de celulasas

La producción de celulasas es un tema importante en la industria biotecnológica. Las celulasas son un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de la celulosa, convirtiéndola en azúcares fermentables. Existen dos principales estrategias para la producción de celulasas: la fermentación sumergida (SmF) y la fermentación en estado sólido (SSF) (Ellila et al., 2017).

La fermentación sumergida (SmF) se refiere al cultivo de microorganismos en un medio líquido que contiene los nutrientes necesarios. Este método es ampliamente utilizado para la producción de celulasas, especialmente con hongos de los géneros *Trichoderma* sp. y *Aspergillus* sp. La SmF permite un mejor control de los parámetros del proceso como pH, temperatura y oxigenación, lo que favorece la producción enzimática (Mrudula y Murugamm, 2011).

Por otro lado, la fermentación en estado sólido (SSF) implica el crecimiento de microorganismos sobre sustratos sólidos con bajo contenido de humedad. Este método se ha propuesto como una alternativa más económica y eficiente para la producción de celulasas, ya que utiliza residuos agroindustriales como sustratos de bajo costo. En la SSF, los microorganismos tienen acceso directo al sustrato sólido, lo que puede mejorar la producción de enzimas (Bairagi, 2016).

Ambas estrategias, SmF y SSF, han demostrado ser efectivas para la producción de celulasas. La elección del método dependerá de factores como la

disponibilidad de sustratos, los requerimientos del proceso y los costos de producción. En general, la SSF se considera más adecuada para la utilización de residuos lignocelulósicos, mientras que la SmF permite un mayor control de las condiciones de cultivo (Ellila et al., 2017).

Las celulasas comerciales del mercado mundial provienen de microorganismos. La producción de celulasas por microorganismos a escala industrial es muy factible por la capacidad de controlar las fases de producción de la enzima; donde destacan las celulasas que provienen de hongos porque tienen mayor actividad enzimática en comparación con otros microorganismos (Tabla 3 y 4) y porque pueden crecer en sustratos baratos. (Álvarez et al., 2014).

Los estudios presentados por Yoon y colaboradores (2019) demuestran la aplicación de celulasas para la producción de biocombustibles; efectuando fermentación in situ del hongo *Pycnoporus sanguineu* junto a *Saccharomyces cerevisiae* utilizando bagazo de caña, en donde el hongo logró producir celulasas que permitieron la sacarificación de la celulosa para liberar azúcares que luego se fermentaron para producir etanol por *Saccharomyces cerevisiae*.

**Tabla 3***Producción de celulasas por microorganismos celulolíticos*

<b>Microorganismo</b>	<b>Sustrato</b>	<b>Método</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Actividad Enzimática</b>	<b>Referencia</b>
<i>Trichoderma atroviride</i>	Residuos vegetales	SSF	5 días	CMCase (178,92 U/g), FPase (98,89 U/g)	Bairagi, (2016)
<i>Trichoderma reesei</i>	Casco de soja	SSF	96 h	19,3g/L	Ellila et al., (2017)
<i>Aspergillus niger</i>	Salvado de trigo y paja de trigo	SSF	96 h	CMCase (14,8 U/g)	Jecu, (2000)
<i>Aspergillus niger</i>	Residuos de fibra de coco	SmF	72 h	CMCase (8,89 U/g), FPase (3,56 U/g)	Mrudula y Murugamm, (2011)
<i>Aspergillus niger</i>	Cáscara de piña	SmF	48 h	celulasa (0,92 U/mL)	Kannahi y Elangeswari, (2015)
<i>Aspergillus sp.</i>	Paja de trigo	SSF	7 días	CMCase (487U/mL), FPase (79 U/mL)	Hammad et al., (2010)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Paja de arroz y salvado de trigo	SSF	4 días	CMCasa (14,7 U/g), $\beta$ - glucosidasa (8,51 U/g), FPasa (0,93 U/g)	Sherief et al., (2010)

SSF: Fermentación sumergida  
SmF: Fermentación en estado sólido

**Tabla 4***Microorganismos y propiedades celulolíticas*

<b>Especie microbiana</b>	<b>Fuente</b>	<b>Enzima</b>	<b>Características</b>	<b>Referencias</b>
<i>Streptomyces griseoaurantiacus</i>	Residuos municipales	Endoglucanasa y $\beta$ -glucosidasa	pH hasta 11 y 45°C	Buenrostro et al., (2000)
<i>Bacillus subtilis subsp. Subtilis</i>	Sedimentos marinos	CMCase, FPase, celobiase	50°C	Gaitan y Perez, (2007)
<i>Bacillus sp.</i>	Suelo	CMCase y avicelasa	pH 4 y 60°C	Gaitan y Perez, (2007)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Pozos geotérmicos	CMCase	Termoestable (60-80 °C)	Kiio et al., (2016)
<i>Trichoderma sp.</i>	Suelo	Celulasa	pH 3	Andrade et al., (2011)
<i>Aspergillus sp.</i>	Suelo	CMCase	pH 5 y 70 °C	Mohammed y Fagade (2010)
<i>Talaromyces emersonii</i>	Suelo	Endoglucanasa con celobiohidrolasa y FPase	pH 4 y 80 °C Termoestable	Brienzo et al., (2008)

Entre los microorganismos empleados, son los hongos filamentosos que, por la formación de hifas, les permiten colonizar matrices sólidas y ser más eficientes, secretan enzimas hidrolíticas, tienen tolerancia a baja actividad del agua y resistencia a condiciones de alta presión osmótica (Ferrer, 2011).

#### **2.2.6 Medición de actividad enzimática**

La actividad enzimática se refiere a la capacidad de una enzima para catalizar una reacción química específica. Las enzimas son proteínas que actúan como biocatalizadores, acelerando las tasas de reacción. La actividad enzimática es fundamental para numerosos procesos biológicos y tiene aplicaciones significativas en diversos campos como la industria, la medicina y la investigación (Vilches, 2002).

La actividad enzimática se puede medir cualitativa y cuantitativamente, dependiendo de los objetivos del estudio y de las técnicas disponibles.

##### ***Actividad enzimática cualitativa***

La actividad enzimática cualitativa se refiere a la detección de la presencia de una enzima y a menudo se utiliza para identificar la producción en medios sólidos, como agar o en placas de Petri. Algunos métodos cualitativos comunes incluyen:

- **Formación de halo:** Se observa la formación de una zona transparente alrededor de la colonia bacteriana en medio sólido que indica la actividad enzimática.
- **Tinción específica:** Se utilizan reactivos que cambian de color en presencia de ciertas enzimas, permitiendo la visualización de la actividad en medios sólidos. Carrasco et al., (2016).

#### *Actividad enzimática cuantitativa*

La actividad enzimática cuantitativa implica la medición precisa de la cantidad de producto formado por la enzima en un período de tiempo específico. Estos métodos se basan en técnicas espectrofotométricas, cromatográficas o de otras formas de detección que permiten una cuantificación precisa de la actividad enzimática (Najeeb et al., 2015). La medida de la velocidad de una reacción catalizada por una enzima se da por la mezcla de soluciones de sustrato y de enzima pura apropiada, tiempo cero, en condiciones isotérmicas, con una solución amortiguadora (tampón) para controlar el pH. (Bradford M., 1976). La medición de las concentraciones de sustrato y producto es cuantificada mediante técnicas espectrofotométricas.

Se suele expresar la actividad enzimática específica de diferentes maneras. Ejemplo en unidades enzimáticas arbitrarias por  $\mu$ moles, donde la unidad enzimática está relacionada con la descomposición o formación de cierto sustrato o

producto en cierto tiempo, en términos de la velocidad constante de reacción por  $\mu$ moles de enzima. Una unidad (U) de una enzima es definida como la cantidad que catalizará la transformación de 1  $\mu$ mol de sustrato por minuto (Vilches, 2002).

La medición de la celulasa total (se refiere a la actividad combinada de todas las enzimas que participan en la degradación de la celulosa), se emplea un método espectrofotométrico que generalmente implica la cuantificación del azúcar liberado como producto de la hidrólisis de la celulosa. Se utiliza un sustrato de celulosa como el papel filtro, que es fácilmente hidrolizable por diversas enzimas celulolíticas (Najeeb et al., 2015)

La medición de la actividad de Endoglucanasa se realiza de manera similar a la celulasa total, pero se centra en su capacidad para romper los enlaces glucosídicos dentro de las cadenas de celulosa. Se utiliza un sustrato de celulosa que puede ser afectado por la endoglucanasa, como el CMC (Tabla 5), luego se mide la liberación de productos solubles de celulosa y se cuantifica utilizando métodos espectrofotométricos (Carrasco et al., 2016).

En la medición de la actividad de  $\beta$ -glucosidasa se utiliza un sustrato que contiene un grupo  $\beta$ -glucosídico susceptible a la hidrólisis por la  $\beta$ -glucosidasa como p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (p-NPG) o 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucopiranosido (MUG). La medición del producto liberado como p-nitrofenol (en el caso de p-NPG) o 4-metilumbeliferona (en el caso de MUG) se mide espectrofotométricamente a una longitud de onda específica. Estos compuestos

tienen propiedades absorbentes que permiten cuantificar la cantidad de producto formado (Fortes et al., 2010).

La medición de la actividad Exoglucanasa permite conocer la capacidad de la enzima para liberar glucosa de los extremos de las cadenas de celulosa. Se emplea un sustrato que tenga extremos libres de celulosa, como la celobiosa o la celulosa cristalina (Tabla 5). La liberación de glucosa o celobiosa se mide espectrofotométricamente o mediante técnicas cromatográficas para cuantificar la actividad exoglucanasa (Ardhi y Sulistyarsi, 2017)

**Tabla 5**

*Métodos para la determinación de actividades enzimáticas.*

<b>Cuantificación</b>	<b>Sustrato</b>	<b>Referencia</b>
Celulasa total	Papel de filtro Wathman N°1	Najeeb et al., (2015)
Endoglucanasa	Carboximetil celulasa	Carrasco et al., (2016)
Exoglucanasas	Avicel®	Ardhi y Sulistyarsi (2017)
$\beta$ - glucosidasas	p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosida	Fortes et al., (2010)
Endoglucanasa	Azo-CM-celulosa	Sena et al., (2011)

## CAPÍTULO III

### MARCO METODOLÓGICO

#### 3.1 Tipo y diseño del estudio

El área donde se tomaron las muestras de material en proceso de compostaje fue la planta de compostaje de Ciudad Nueva y la planta de la Municipalidad de Tacna. La ejecución de los procedimientos experimentales de aislamiento se hizo en el Laboratorio de Biotecnología enzimática de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

En el presente estudio se aislaron 8 hongos obtenidos de material compostado en fase termófila, que luego de una selección por evaluación de la actividad celulolítica, solo dos cepas fueron elegidas para ensayos de fermentación y una de ellas para la subsiguiente caracterización de la celulasa.

Además, se identificó molecularmente las cepas seleccionadas para los ensayos de fermentación y se caracterizó la enzima producida (en términos de pH, temperatura y termoestabilidad).

##### 3.1.1 Población y muestra

La población estuvo constituida por todas las cepas de hongos que crecen en la fase termófila del compostaje y cuyo número es desconocido. Una muestra de 8 cepas fúngicas, fueron extraídas en función de los límites nutricionales del medio

de cultivo y las condiciones aplicadas en el ensayo de aislamiento. De entre los aislados solo 5 tenían capacidad de producir celulasas, según ensayo de selección de hongos con capacidad celulolítica.

### **3.1.2 Diseños estadísticos de los experimentos**

El tipo de investigación fue descriptiva porque tiene como propósito describir los datos y características observadas de un determinado fenómeno de estudio.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se tomaron datos representativos como sus valores medios. Estos datos se organizaron mediante estadística descriptiva según la procedencia cualitativa o cuantitativa de la variable o indicador medido. Se incluyeron análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de comparación para destacar las medias como diferentes o mejores de acuerdo con los grupos homogéneos obtenidos entre los cuales existe diferencia significativa. En consecuencia, los ensayos cualitativos de observación, presencia o ausencia de halos que indicaron actividad celulolítica, se procesaron mediante un ANOVA de un factor y se aplicó la prueba de múltiples rangos de Duncan.

### 3.1.3 Operacionalización de variables

En este estudio se trabajó con variables descriptivas (características macroscópicas y microscópicas, producción de celulosa, características bioquímicas de la celulosa).

- ***Aislamiento e identificación de hongos celulolíticos del compost en fase termófila.***

Las variables son cualitativas nominales como la identidad del microorganismo; morfología de la colonia, etc.

- ***Selección de cepas fúngicas con mayor producción de celulosa.***

Las variables son cualitativas nominales, mediante la detección de actividad celulolítica de presencia o ausencia de halos.

- ***Producción de celulosa fúngica utilizando residuos vegetales.***

Se evaluarán variables cuantitativas a través de la medición de la actividad enzimática específica expresada en U, una unidad de una enzima (definida como la cantidad que catalizará la transformación de 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto).

- ***Caracterización de celulosa fúngica para su bioprospección.***

En este componente, se obtuvieron valores cuantitativos de cómo será el comportamiento de la enzima celulosa obtenida; evaluando pH, temperatura y termoestabilidad.

**Tabla 6***Operacionalización de las variables de estudio*

<b>Variab</b>	<b>Indicador</b>	<b>Escala de medición</b>
<b>Variable independiente:</b> Hongo	- Concentración de la cepa fúngica	conidios/mL
	- Relación porcentual inóculo / Medio de producción.	% (V/V)
<b>Variable dependiente:</b> Producción de celulasa	- Actividad enzimática catalítica	U/mL
	- Actividad enzimática específica	U/mg
	- Rendimiento	U/gss

## 3.2 Materiales

### 3.2.1 Material de laboratorio

- Micropipetas (0,5-10; 5-50; 20-200; 100-1000  $\mu$ L)
- Dispensador de líquidos
- Matraces de Erlenmeyer (50, 100, 250, 500, 1000 mL)
- Probetas (25, 50, 100, 500 y 1000 mL)
- Vasos de precipitados (50, 100, 250, 500, 1000 mL)
- Tubos de ensayo
- Placas Petri
- Vernier

### 3.2.2 Material biológico

Se utilizaron cepas fúngicas provenientes de muestras del compost en fase termófila, que fueron seleccionados en base su capacidad celulolítica determinada cualitativa y cuantitativamente. Las mismas fueron procesadas en el Laboratorio de Biotecnología Enzimática de la Facultad de Ciencias, Universidad Jorge Basadre Grohmann.

### 3.2.3 Reactivos

Nombre	Marca
Acetato de sodio	Merck
Ácido dinitrosalicílico (DNS)	Acros Organics
Agar agar	Fisher
Agar Czapek	Oxoid
Carboximetilcelulosa (CMC)	Merck
Celulosa microcristalina (CM)	Sigma
Cloruro de sodio	Merck
Cloruro de calcio	Merck
Extracto de levadura	Oxoid
Fenol	Panreac
Fosfato mono potásico	JT Baker

Nombre	Marca
Glicerol	Panreac
Lugol	Merck
Metabisulfito de sodio	Sigma
Papel filtro Whatman N°1	GE Healthcare
Peptona	Fisher
Rojo de Congo	HiMEDIA
Sacarosa	Merck
Sulfato de amonio	Merck
Sulfato de fierro	Merck
Sulfato de magnesio	Merck
Tartrato de sodio y potasio	CDH

### 3.2.4 Equipos

Nombre	Marca
Autoclave	SHENAN
Balanza analítica	A&D
Cabina de bioseguridad tipo A2	LABCONCO
Centrífuga refrigerada	HETTICH
Cocinilla eléctrica	FINEZZA
Horno esterilizador	MMM
Incubadoras estáticas	THERMO SCIENTIFIC
Lector de microplaca	BIOTEK

Nombre	Marca
Licuadora	OSTER
Microscopio tri ocular con cámara	EUROMEX
Potenciómetro (pHmetro)	CONSORT
Ultracongeladora	THERMO SCIENTIFIC
Vórtex	THERMO

### 3.3 Aislamiento de hongos filamentosos del compost

Se tomaron muestras en fase termófila de las plantas de compostaje de la Municipalidad Provincial de Tacna y del Distrito de Ciudad Nueva.

La toma de muestra fue a una profundidad mayor a 40 cm en que la temperatura de las pilas se encontró a 45°C, 50°C, 60°C y 70°C. Se usó bolsas de polipropileno estériles y se transportaron en una caja de tecnopor hacia el Laboratorio de Biotecnología Enzimática de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann y se analizaron el mismo día de recolectada la muestra.

El proceso de aislamiento se inició, mezclando 10 g de muestra húmeda con 90 mL de solución salina estéril (NaCl) a 0,85 % y se homogenizo mediante agitación a 180 rpm a temperatura ambiente, por 30 minutos (Anastasi et al., 2005).

A partir de la solución homogenizada, se realizaron diluciones en serie utilizando solución salina estéril (NaCl) a 0,85 % en tubos de 20 mL, desde  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  (volumen de 9 mL cada uno).

Para el proceso de siembra, se prepararon los medios de cultivo sólidos siguientes: Agar papa dextrosa (PDA), Agar extracto de Malta (MEA), y Agar Sacarosa con extracto de levadura (YES). Todos los medios fueron esterilizados por autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Después del autoclavado, se adicionó cloranfenicol (50-100 mg/L) a los medios de cultivo en condiciones estériles filtrando la solución utilizando una jeringa. Finalmente, los medios fueron plaqueados en placas de Petri (15 mL) para su uso respectivo (Anastasi et al., 2005).

Luego se realizó la siembra por diseminación en placa Petri utilizando asa de Drigalski, el volumen del inóculo fue de 100  $\mu\text{L}$  tomados de cada una de las diluciones preparadas anteriormente ( $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ ), se sembraron por duplicado en los medios PDA, YES y MEA para cada una de las diluciones preparadas de las pilas muestreadas (temperaturas de  $45^{\circ}\text{C}$ ,  $50^{\circ}\text{C}$ ,  $60^{\circ}\text{C}$  y  $70^{\circ}\text{C}$ ).

Los cultivos se incubaron a temperaturas de  $40^{\circ}\text{C}$ ,  $50^{\circ}\text{C}$ ,  $60^{\circ}\text{C}$  y  $70^{\circ}\text{C}$  durante 7 días bajo cámara húmeda. Se hicieron revisiones de las placas para observar el crecimiento de las colonias con frecuencia interdiaria (Anastasi et al., 2005).

Una vez visualizado la aparición de colonias se realizaron dos repiques tomando como inóculo una asada de la colonia aislada y preparando una suspensión

de conidios con una concentración entre 50 – 100 esporas por mililitro aproximadamente (el conteo de conidios fue en cámara de Neubauer). Para ello se hicieron varias diluciones, tomando 10  $\mu$ L de la suspensión preparada y agregando 90  $\mu$ L de agua destilada mezclando con agitación en vortex.

Se realizó la siembra por disseminación con asa de Drigalski utilizando 100  $\mu$ L (de una suspensión de 50-100 esporas / mL) en placas con medio PDA que fueron incubadas a 50°C durante 96 horas.

### **3.3.1 Cultivo monospórico**

Las cepas fúngicas fueron reactivadas en tubos de ensayo conteniendo 2 mL de Caldo de Soya Trypticasa y se incubaron a 50°C durante 24 a 48 horas. Una vez que los hongos formaron micelios, se realizó la siembra por punción en ángulo recto en el centro de la placa conteniendo el medio de cultivo PDA, incubando a 50 °C durante 5 - 7 días hasta visualizar la esporulación (Cañedo, 2004).

Posteriormente, se preparó una solución de Tween-80 al 0,1% (v/v) de la siguiente manera: se tomó 10 mL de Tween-80 y se añadieron 90 mL de agua destilada; de esta solución, se tomó 1 mL y se agregaron 99 mL adicionales de agua destilada. Finalmente, esta solución se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos (Cañedo, 2004).

Con un asa estéril, se arrastraron las esporas de las placas del hongo crecido para suspenderlas en un microtubo que contenía 1 mL de la solución de Tween al 0,1% y se agitó en un vortex durante 15 segundos para separar las esporas. Se realizaron diluciones tomando 100  $\mu$ L de la suspensión anterior y agregando 900  $\mu$ L de agua destilada, agitando nuevamente en vortex. Las esporas fueron contadas en cámara de Neubauer buscando obtener una suspensión con una concentración aproximada de 50 – 100 esporas por mililitro, para lo cual se realizaron varias diluciones (Cañedo, 2004).

Luego, se realizó la siembra por disseminación con el asa de Drigalsky utilizando 100  $\mu$ L de una suspensión de 50-100 esporas/mL en placas con medio PDA, las cuales fueron incubadas a 50°C durante 72 horas. Las colonias en formación se cortaron en todo el diámetro y se transfirieron a viales con medio PDA inclinado. Estos viales se incubaron durante 5 días o hasta la esporulación, luego se etiquetaron y conservaron a 4°C (Cañedo, 2004; Anastasi et al., 2005).

### **3.4 Selección cualitativa de hongos con capacidad celulolítica**

A partir de los cultivos monospóricos se realizó la reactivación y siembra individual de cada hongo en placas conteniendo medio PDA para ser incubadas durante un período de 5 días a 50°C (Anastasi et al., 2005).

Se realizó la preselección de hongos según su capacidad de degradar celulosa, para lo cual, se sembraron los hongos aislados utilizando la técnica de

punción en medio sólido suplementado con Carboximetilcelulosa (CMC); el medio estaba compuesto por: CMC 1%; NaNO<sub>3</sub> 0,2%; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1%; MgSO<sub>4</sub> 0,05%; KCl 0,05%; peptona 0,02%; agar 1,7 %; se ajustó a pH 7). Las placas fueron incubadas a 50 °C por 7 días. Los ensayos se realizaron por triplicado (Anastasi et al., 2005).

Después del tiempo de incubación, se inundaron las placas con solución rojo de Congo 0,1 % (p/v) por 20 minutos y luego se realizaron lavados agregando cloruro de sodio a una concentración de 1 M durante 20 minutos para visualizar los halos de hidrólisis (Teather y Wood, 1982; Kasana et al., 2008).

#### **3.4.1 Índice de hidrólisis enzimática de hongos**

Se determinó el índice de hidrólisis enzimático midiendo el diámetro de las colonias y el diámetro del halo de hidrólisis para cada una de las cepas, para ello se utilizó un vernier y se registraron las medidas en milímetros. Estas mediciones permitieron calcular el índice de hidrólisis enzimática según el método descrito por Ferbiyanto et al., (2015) como se detalla a continuación:

$$\text{Índice enzimático} = (\text{Diámetro del halo} - \text{Diámetro colonia}) / \text{Diámetro colonia}$$

La visualización de halos claros alrededor de las colonias en estudio usando el sistema de difusión en placas con agar permitió la obtención de promedios de índices enzimáticos. Estos valores se compararon mediante la prueba de Duncan

con objeto de separar grupos significativamente diferentes y de entre ellos se pudo seleccionar por conveniencia al grupo de mayor actividad.

### **3.4.2 Influencia del pH en el crecimiento de hongos celulolíticos**

Se preparó 45 mL de medio Caldo Papa Dextrosa en matraces de 100 mL. El pH de cada matraz Erlenmeyer se ajustó a tres tratamientos: pH 5, pH 7 y pH 10 utilizando Tampón acetato de sodio (pH 5), fosfato de sodio (pH 7), y Glicina NaOH (pH 10). Posteriormente, el medio se esterilizó en autoclave (Henao et al., 2006).

Para la preparación del inóculo, se procedió a resuspender las esporas de los hongos seleccionados en una solución de Tween 80 al 0,1% utilizando un asa esterilizada. Posteriormente, se llevó a cabo el conteo de esporas utilizando una cámara de Neubauer para determinar la concentración del inóculo, que se estableció en  $10^7$  conidios/mL. Seguidamente, se preparó un volumen total de 5 mL de inóculo, el cual fue transferido a matraces Erlenmeyer que contenían 45 mL de medio Caldo Papa Dextrosa. Se incubó a 50°C durante 5 días. Finalmente, se filtró el medio líquido y se secó el micelio (biomasa) a 60°C en el horno durante 1 hora para luego ser pesado (Henao et al., 2006).

### **3.4.3 Influencia de la temperatura en el crecimiento de hongos celulolíticos**

Las esporas de los hongos seleccionados se resuspendieron en solución Tween 80 al 0,1% y se realizó el conteo en cámara de Neubauer para determinar la concentración del inóculo, que estuvo compuesto por  $10^7$  conidios/mL. El volumen de inóculo preparado fue de 5 mL, los cuales fueron agregados a matraces Erlenmeyer con 45 mL de medio Caldo Papa Dextrosa ajustado a pH 5 con Tampón acetato de sodio (previamente esterilizado). Se procedió a incubar a diferentes temperaturas: 40°C, 50°C, 60°C, 70°C y 80°C durante 5 días. Al finalizar el tiempo de incubación, se filtró el medio líquido y se secó el micelio (biomasa) a 60°C en el horno durante 1 hora, para posteriormente ser pesado según el método descrito por Henao et al., 2006.

### **3.4.4 Capacidad de crecimiento de los hongos celulolíticos**

Luego de determinar las condiciones de pH y temperatura óptima para el crecimiento; los hongos aislados se sembraron por punción en medio Agar PDA a pH 5 e incubados a 50°C por 8 días, durante cada día se midió el crecimiento radial (Gabiatti et al., 2005; Vega, 2020).

### **3.5 Identificación de cepa fúngica productora de celulasa**

La selección de los hongos celulolíticos fue establecida en base a los índices enzimáticos obtenidos, tomando como hongos candidatos a aquellos que

presentaron los valores más altos. El siguiente criterio de selección fue el crecimiento de los hongos a distintas condiciones de pH y distintas condiciones de temperatura, donde se determinó los valores óptimos. Finalmente se evidenció y evaluó el perfil de crecimiento de los hongos hasta el octavo día utilizando las condiciones óptimas determinadas anteriormente (Gabiatti et al., 2005).

### **3.5.1 Caracterización macroscópica**

Las cepas FC-5 y FC-13 que presentaron actividad de celulasa por la presencia de zonas de hidrólisis determinada cualitativamente; fueron seleccionadas para identificar el género y posiblemente la especie, se utilizó clave taxonómica donde se consideraron características tanto macroscópicas como microscópicas para la cepa FC-5 (Anexo 12). Los aislamientos de cada cepa fueron examinados en varios medios de cultivo como PDA, Agar extracto de malta (MEA), Agar Autolisado de levadura Czapek (CYA) y Agar sacarosa extracto de levadura (YES), con el fin de caracterizar macroscópicamente e inducir estructuras de reproducción. Los cultivos fueron incubados a 50°C durante 5 días, y se registró el crecimiento de las colonias, anotando detalles como la forma, superficie, borde, pigmentación y textura de las colonias. (Wabusya y Vicent, 2015; Vega 2020).

### **3.5.2 Caracterización microscópica**

Se utilizó colonias aisladas a partir de cultivo monospórico, que fueron reactivadas en Caldo de soya tripticasa a 50°C durante 2 días, luego se realizó la siembra en placas con medio PDA e incubadas durante 7 días a 50°C, se tomó una asada del micelio y se colocó esparciendo sobre una lámina portaobjetos que contuvo una gota de azul de lactofenol. Se visualizaron en microscopio óptico compuesto de luz blanca en inmersión las siguientes estructuras: hifas, conidióforo, métula, fiálide y conidios. Se anotaron la forma que presentaban y para el tamaño se tomaron cinco medidas promedio del largo x ancho. (Herrera et al., 2005; Vega, 2020).

Posteriormente, ser confrontadas con las descripciones reportadas por los autores en la literatura sobre identificación de hongos filamentosos. La literatura que se utilizó fue: Barnett y Hunter, 1972; Samson et al., 2000; Samson et al., 2004.

### **3.5.3 Identificación molecular**

La identificación de los hongos fue realizada mediante análisis de secuencias de la región ITS. Esta sección involucró las siguientes actividades, primero, se extrajo el ADN genómico, luego, se generaron amplicones ITS que se enviaron por servicio de secuenciación y después se procesaron y analizaron las secuencias mediante programas bioinformáticos (Ezeonuegbu et al., 2022).

### 3.5.3.1 Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico de los hongos seleccionados con mayor actividad de celulasa (cepas FC-5 y FC-13) se realizó a partir de micelio joven crecido a 50 °C durante 72 horas. Se utilizó el protocolo recomendado y especificado en el kit comercial E.Z.N.A.® Fungal DNA Mini Kit (Cat. D3390-01, Omega Bio-tek), el tamaño de las muestras de micelio se limitó a un peso  $\leq 200$  mg, el cual se colocó en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL y se congeló sumergiéndolo en nitrógeno líquido, enseguida, el tejido se trituró con micro pistilos (Cat 1194N23, Thomas Scientific) y se prosiguió con los procedimientos especificados por el fabricante del kit comercial (Anexo 6). El ADN extraído se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1 % (p/v) para comprobar su integridad. Además, se cuantificó la concentración de ADN utilizando un lector TAKE3 en Epoch2, mediante la lectura de absorbancias a longitudes de onda de 260, 280 y 320 nm. Se utilizó la relación 260/280 para evaluar la pureza del ADN, considerándose un valor óptimo a partir de 1,7.

### 3.5.3.2 Amplificación de productos por PCR

El ADN genómico se utilizó para ejecutar la reacción en cadena de la polimerasa utilizando el kit KOD Hot Start Master Mix (Sigma-Aldrich, Cat. 71842) según protocolo y especificación del fabricante. La reacción de amplificación estuvo compuesta por 5  $\mu$ L de ADN, 1,5  $\mu$ L de *primers forward* y

*reverse* (10  $\mu$ M), 25  $\mu$ L de KOD Hot Start Master Mix, 17  $\mu$ L de agua libre de nucleasas; para un volumen total de 50  $\mu$ L (Ezeonuegbu et al., 2022).

Los parámetros de temperatura y ciclos del PCR fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 2 minutos; seguido de 39 ciclos de desnaturalización de 95°C por 20 segundos, anillamiento de 52°C por 15 segundos, extensión de 70°C por 35 segundos; y extensión final de 40°C por 10 segundos (Ezeonuegbu et al., 2022). Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se utilizó marcador de peso molecular HighRanger 1 kb DNA Ladder (NORGEN Biotek Corp.). Las muestras se almacenaron a -20°C. Los productos amplificados de concentración y calidad adecuada se enviaron mediante servicio a la empresa Macrogen - Corea del Sur para el proceso de secuenciación por el método de Sanger.

### **3.5.3.3 Procesamiento de secuencias y análisis bioinformático**

La secuencia de nucleótidos forward y reverse se analizaron para la elaboración de la secuencia consenso mediante el trimado y ensamblado utilizando el software MEGA v11.0.10. Se hizo el análisis y comparación de las secuencias obtenidas (secuencias en consulta) con las disponibles en la base de datos (*rRNA\_typestrains/ITS\_RefSeq\_Fungi*) del NCBI utilizando BLAST (Herramienta de búsqueda de alineación local básica).

Para el análisis filogenético, se consideraron 15 secuencias de referencia de regiones ITS de la base de datos del NCBI que fueron cercanas en porcentaje de similitud. Estas secuencias se descargaron en formato FASTA y luego se alinearon junto a la secuencia de las cepas FC-5 y FC-13 a través del programa Mega 11 (Tamura et al., 2021) utilizando la herramienta ClustalW, con un valor 50 para Gap Opening Penalty y 10 para Gap Extensión Penalty, tanto para el alineamiento por pares y el alineamiento múltiple. Se determinó el mejor modelo para la inferencia filogenética mediante la herramienta Models, disponible en el mismo programa y se generó un árbol filogenético basado en la máxima verosimilitud con un análisis Bootstrap para 500 réplicas (Ezeonuegbu et al., 2022).

### **3.6 Producción de celulasa fúngica utilizando residuo vegetal**

Se eligieron 2 cepas con mayor índice enzimático (FC-5 y FC-13), las cuales se inocularon en medios fermentativos suplementados con residuos vegetales: mazorca de maíz, hojas de perejil, hojas de betarraga; que fueron recolectados como residuos orgánicos vegetales de los contenedores del Mercado Grau de Tacna.

Previamente, los residuos vegetales fueron cortados en trozos de 10 cm y secados a una temperatura de 50 °C en horno durante 5 horas. Se usó un molino (GRONDOY, GR-PV40B) hasta obtener un polvo de partículas finas, realizando este procedimiento hasta 2 veces, para finalmente almacenar el sustrato pulverizado

en pequeños frascos debidamente cerrados y conservados a temperatura ambiente en un desecador (Talekar et al., 2011).

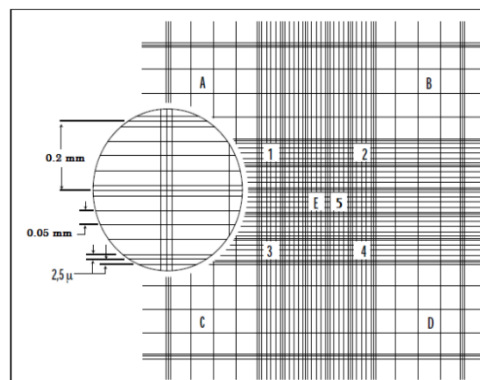
El medio de fermentación fue el de Mandels-Weber (para 100 mL: urea 0,03 g;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,14 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2 g;  $\text{CaCl}_2$  0,03 g;  $\text{MgSO}_4$  0,03 g; extracto levadura 0,025 g; peptona 0,075 g) ajustado a pH 5; sustrato (residuo vegetal) al 1,5 % esparcido en el fondo de un matraz Erlenmeyer de 100 mL). Se agregó 0,1 mL de solución trazas ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  50 mg;  $\text{CoCl}_2$  200 mg;  $\text{MnSO}_4$  16 mg;  $\text{ZnSO}_4$  14 mg disueltos en 10 mL de agua destilada) para cada 100 mL de medio Mandels-Weber final y se esterilizó en autoclave. El inóculo agregado al medio fermentativo fue del 5% (v/v), estuvo constituido de una solución de  $10^7$  conidios/mL (Bonilla, 2020).

La preparación del inóculo fue de la siguiente manera: con el asa se arrastraron las esporas de las placas del hongo crecido para suspenderlas en un microtubo con 1 mL de la solución Tween al 0,1 % y se agitó en un vortex durante 15 segundos para que se separen las esporas. Se realizaron las diluciones tomando 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión anterior agregando 900  $\mu\text{L}$  de solución salina y agitando en vortex. Se contaron las esporas en cámara de Neubauer.

El campo de conteo que se utilizó fue de acuerdo con el tamaño de los conidios del hongo con el que se trabajó. El conteo se realizó en los cuatro cuadros de las esquinas (A, B, C, D) más el cuadro del centro (E) y se repitió por lo menos seis veces y se sacó un promedio (Gilchrist et al., 2005).

### Figura 6

#### *Conformación interna de cámara de Neubauer*



*Nota:* Adaptado de *Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada*, por Gilchrist et al., 2005.

Con los datos obtenidos, se calculó un valor de la media; éste se multiplicó por una constante (10 000) que fue el de la cámara de Neubauer. De ese producto se obtuvo la concentración en conidios/mL, entonces:

$$\text{Promedio obtenido} \times \text{constante} = \text{concentración en conidios/mL}$$

La fermentación se realizó a 50 °C y se tomaron muestras de 1,5 mL del extracto crudo en microtubos cada 24 horas durante 7 días y se determinó la

actividad de la enzima medida por determinación de azúcares reductores liberados en reacción por el método del DNS (Siqueira et al., 2020). Se preparó una curva de calibración utilizando patrón de glucosa 4,32 mg/mL para generar diluciones de 0,48; 0,96; 1,44; 1,92; 2,4; 2,88; 3,36; 3,84; 4,32; 4,8  $\mu\text{mol/mL}$ .

### **3.6.1 Obtención del extracto crudo enzimático**

Una vez que se determinó el valor máximo de actividad enzimática al séptimo día de iniciada la fermentación se procedió a colocar 1,5 mL de extracto crudo en varios tubos eppendorf y se centrifugó a 6000 rpm por 15 a 20 minutos a 10°C. Posteriormente se separó las fases, recuperando el sobrenadante y descartando el precipitado (Baig y Saleem, 2012); dicho sobrenadante se pasó por embudo con papel filtro para eliminar residuos no deseados.

### **3.6.2 Determinación de proteínas totales**

La determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford donde la cuantificación con un colorante, el Azul de Coomassie G-250, a la proteína y la comparación de esta unión con la de diferentes cantidades de una proteína estándar Albúmina de Suero Bovino (BSA) permitió determinar la gráfica de la absorbancia vs la concentración de proteínas, obteniendo una curva de calibración de la proteína estándar. Con esta curva de calibración, se logró interpolar la concentración de proteínas en una muestra al medir su absorbancia a 595 nm.

La reacción fue una mezcla de 20  $\mu\text{L}$  de muestra de extracto crudo y 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford, enseguida se incubó por 2 minutos para asegurar el final de la reacción; finalmente se realizó la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. (Anexo 9).

### **3.6.3 Determinación de la actividad catalítica**

La actividad de celulasa total (FPasa, actividad sobre papel filtro) se determinó mediante la cuantificación glucosa liberada cuando el extracto crudo se expuso a pequeños discos papel filtro Whatman No.1 (diámetro 9 cm, tamaño de poro 11  $\mu\text{m}$ ), El procedimiento se realizó siguiendo la metodología propuesta por Ghose (1987), el volumen final de reacción fue de 62  $\mu\text{L}$  en donde se calculó el contenido de azúcares reductores por el método del DNS (Siqueira et al., 2020). Los volúmenes de la reacción se detallan en la Tabla 7.

**Tabla 7**

*Ensayo para determinación de actividad enzimática de celulasas totales (FPU).*

<b>Reactivos</b>	<b>Blanco del reactivo (BR)</b>	<b>Blanco del Sustrato (BS)</b>	<b>Blanco de la Enzima (BE)</b>	<b>Enzima Sustrato (ES)</b>
Tampón Acetato de Sodio pH5 100 mM	0	41 µL	41 µL	41 µL
Papel Filtro Whatman N°1 (disco)	0	1 disco	0	1 disco
Extracto enzimático	0	0	21 µL	21 µL
Agua destilada (µL)	62 µL	21 µL	0	0
Total	62 µL	62 µL	62 µL	62 µL
Incubar a 60 °C por 60 minutos				
Reactivo DNS (µL)	122 µL	122 µL	122 µL	122 µL
Baño de agua hirviendo por 5 min, inmediatamente enfriarlos en agua fría.				
Trasvasar 100 µL de reacción a microplaca transparente de fondo plano				
Agua destilada (µL)	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Lectura λ 540 nm				

La actividad catalítica fue calculada mediante lo siguiente:

$$FPU = AR \text{ liberados} \times Vrx / (Venz * t \times d)$$

Donde:

FPU: Expresada en U/mL

AR: Azúcares reductores

d: Dilución a la cual se trabajó la enzima

Vrx: Volumen de reacción

Venz: Volumen de enzima

t: tiempo de reacción

#### **3.6.4 Determinación de la actividad específica**

Se calculó al dividir la actividad catalítica con el contenido proteico de la dilución de enzima empleado en la reacción:

$$FPU (U/mg) = \frac{\text{Actividad catalítica (U/mL)}}{\text{Concentración proteína (mg/mL)}}$$

#### **3.6.5 Determinación del rendimiento**

Se calculó dividiendo las unidades totales de enzima producida de todo el extracto crudo entre los gramos de sustrato seco utilizados al inicio de la fermentación, como se indica:

$$R (U/g) = \frac{\text{Actividad total (U)}}{\text{Sustrato vegetal seco (g)}}$$

### **3.7 Caracterización de la enzima celulasa**

En una primera etapa se realizó la producción de celulasa de la cepa FC-05 seleccionada, el medio de producción estuvo compuesto por 1,5 % (p/v) del sustrato orgánico en el que se observó mayor actividad (hojas de perejil molido); el cual fue lavado y desinfectado previamente para luego iniciar con el pretratamiento.

Se preparó matraces con 100 mL de solución Mandels-Weber ya detallado anteriormente, el inóculo agregado al medio fermentativo fue del 5% (v/v) y estuvo constituido de una solución de  $10^7$  conidios/mL. La fermentación se realizó a 50 °C durante 7 días.

Se trasvasó el extracto crudo en tubos falcón de 50 mL y se centrifugó a 6000 rpm por 15 a 20 minutos. Posteriormente se separó las fases, recuperando el sobrenadante y descartando el precipitado; dicho sobrenadante se pasó por embudo con papel filtro para eliminar residuos no deseados. Se almacenó en tubos falcón para concentrar la enzima.

#### **3.7.1 Fraccionamiento por sulfato de amonio**

El extracto crudo de la enzima celulasa se obtuvo mediante la centrifugación del medio fermentativo a 6000 rpm por 15 a 20 minutos a 10°C. El método de fraccionamiento con sulfato de amonio se realizó basándonos en Kamble y Jadhav (2012). Se disolvió sulfato de amonio sólido con 100 mL de extracto crudo en agitación a 200 rpm a 4°C; llevando a unas concentraciones de 35%, 45% y 55%

(p/v) gradualmente. Luego los precipitados y el sobrenadante se separaron mediante centrifugación de microtubos con 1,5 mL de solución a 12 000 rpm por 5 minutos a 10°C. Se recolectó los sobrenadantes y se registró la cantidad para continuar con la siguiente concentración de sulfato de amonio.

El precipitado se resuspendió con tampón Tris HCl 50 mM pH 7; recuperando todos los precipitados y colocándolos en dispositivo de filtración tangencial (Amicón 10 KDa), sobre ello se agregó 2 mL de tampón Tris HCl 25 mM pH 7, se resuspendió y centrifugó a 8000 rpm. Se repitió los lavados en el Amicón 10 veces. Se tomó muestra del eluido y se midió actividad enzimática. La enzima precipitada en el Amicón se diluyó con tampón acetato de sodio (pH 5,0) y se midió su actividad enzimática para estimar la concentración crítica de sulfato de amonio a la cual ocurre la precipitación, conocida como concentración de saturación.

### **3.7.2 Efecto del pH sobre la actividad celulasa**

Se preparó los tampones acetato de sodio (pH 4 y pH 5), fosfato de sodio (pH 6 y pH 7), Tris-HCl (pH 8), Glicina NaOH (pH 9 y pH 10); para la caracterización de la enzima celulasa (Sulyman et al., 2020). La reacción se realizó en una placa termorresistente preparando lo siguiente: un blanco reactivo (BR) con 62  $\mu$ L de agua destilada; un blanco sustrato (BS) de 41  $\mu$ L de Tampón acetato de sodio pH 5 a 100 mM con 21  $\mu$ L de agua destilada y un disco de papel filtro Whatman (diámetro 9 cm, tamaño de poro 11  $\mu$ m); blanco de la enzima (BE) de 21

$\mu\text{L}$  de enzima con 41  $\mu\text{L}$  de tampón acetato de sodio pH 5 a 100 mM; y la mezcla enzima sustrato (ES) de 41  $\mu\text{L}$  de tampón acetato de sodio pH 5 a 100 mM con 21  $\mu\text{L}$  de enzima. Se incubó la placa a 60°C por 60 minutos, y luego se agregó 122  $\mu\text{L}$  de DNS para poner a hervir 5 min en baño de agua hirviendo, se dejó enfriar para luego trasvasar 100  $\mu\text{L}$  de reacción a microplaca transparente de fondo plano. Finalmente se agregó 100  $\mu\text{L}$  de agua destilada y realizó la lectura de absorbancias a una longitud de onda de 540 nm.

Las lecturas de cada pocillo se obtuvieron restando el blanco de reactivo (BR) de forma automática en el equipo. La absorbancia neta fue de la siguiente manera:  $LN = ES - (BE + BS)$ .

Se determinó la concentración de azúcares reductores [AR] utilizando la curva estándar de glucosa con la ecuación de regresión encontrada previamente. Finalmente, la actividad enzimática de celulasas fue calculada mediante la siguiente expresión:

$$Act. \text{ enzimática } (U/mL) = \frac{Glucosa \left( \frac{\mu\text{mol}}{mL} \right) \times Vol. \text{ reacción } (mL) \times Dilución^{-1}}{Vol. \text{ solución enzimática } (mL) \times Tiempo \text{ de reacción } (min)}$$

Los resultados de actividad celulasa fueron expresados en U/mL.

### **3.7.3 Efecto de la temperatura sobre la actividad celulasa**

Se preparó reacciones enzimáticas para temperaturas de 40°C, 50°C, 60°C, 70°C y 80°C, utilizando el tampón acetato pH 5 y sustrato papel filtro Whatman N°1, (Maheshwari et al., 2000). La reacción se realizó en una placa termorresistente preparando lo siguiente: un blanco reactivo (BR) con 62 µL de agua destilada; un blanco sustrato (BS) de 41 µL de tampón fosfato de sodio pH 5 a 100 mM con 21 µL de agua destilada y un disco de papel filtro Whatman.

Los ensayos se hicieron por triplicado, se preparó el blanco de la enzima (BE) conformado por: 21 µL de enzima con 41 µL de tampón acetato de sodio pH 5 a 100 mM; y la mezcla enzima sustrato (ES) de 41 µL de tampón acetato de sodio pH 5 a 100 mM con 21 µL de enzima. Se incubó la placa a 60°C por 60 minutos, y luego se agregó 122 µL de DNS para poner a hervir 5 min en baño de agua hirviendo, se dejó enfriar para luego trasvasar 100 µL de reacción a microplaca transparente de fondo plano. Finalmente se agregó 100 µL de agua destilada y realizó la lectura de absorbancias a una longitud de onda de 540 nm (Lübeck, 2018).

### **3.7.4 Termoestabilidad de la enzima celulasa**

Se colocó 40 µL de enzima en tubos PCR de 0,2 mL y se incubaron a 5 temperaturas distintas: 40°C, 50°C, 60°C, 70°C y 80°C. Con ayuda de una micropipeta multicanal se colocó 21 µL de la enzima sobre 41 µL de tampón acetato de sodio pH 5 a 100 mM y un disco de papel filtro Whatman N°1 para iniciar la

reacción enzimática, se procedió a rotular temperatura y anotar la hora de inicio (Abdullah et al., 2021). Se recolectó las soluciones enzimáticas a diferentes tiempos: t1 (30 minutos), t2 (60 minutos), t3 (120 minutos), t4 (240 minutos), t5 (300 minutos). La actividad se determinó según la Tabla 7.

La reacción se realizó en una placa termorresistente preparando: un blanco reactivo (BR) con 62  $\mu\text{L}$  de agua destilada; un blanco sustrato (BS) de 41  $\mu\text{L}$  de tampón acetato de sodio pH 5 a 100 mM con 21  $\mu\text{L}$  de agua destilada y un disco de papel filtro Whatman N°1. Se realizaron los ensayos por triplicado; se incubó la placa a 60°C por 60 minutos, y luego se agregó 122  $\mu\text{L}$  de DNS para poner a hervir 5 min en baño de agua hirviendo, se dejó enfriar para luego trasvasar 100  $\mu\text{L}$  de reacción a microplaca transparente de fondo plano. Finalmente se agregó 100  $\mu\text{L}$  de agua destilada y realizó la lectura de absorbancias a una longitud de onda de 540 nm (Lübeck, 2018).

## **CAPÍTULO IV**

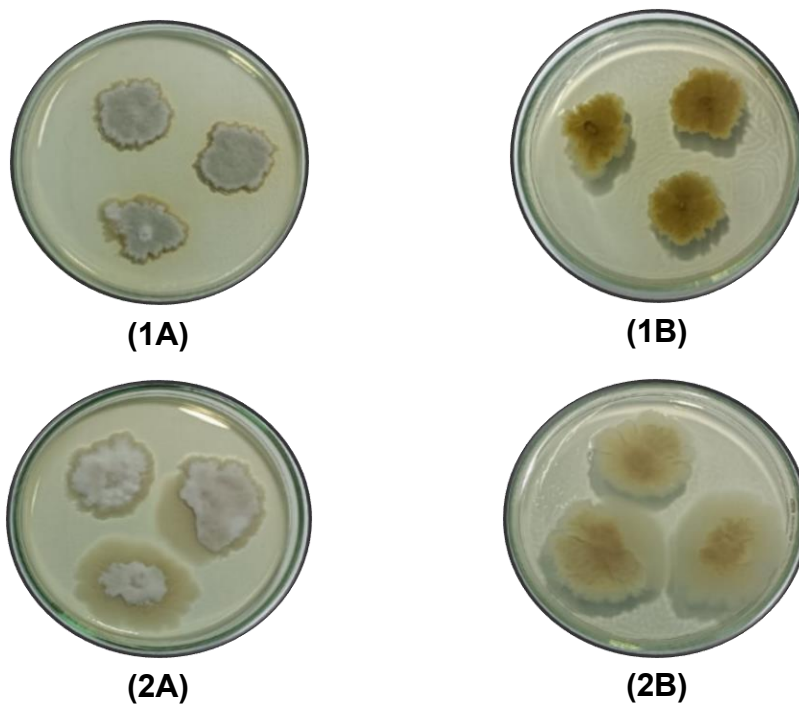
### **RESULTADOS**

#### **4.1. Aislamiento de hongos filamentosos del compost**

Se aislaron un total de 8 hongos del área de compostaje a una profundidad de 40 cm donde las temperaturas se encontraban entre 50° y 60°C. Las cepas de hongos fueron conservadas en viales con PDA a 8°C (Anexo 3), a partir de la preparación de cultivos monospóricos. Luego se realizaron las reactivaciones para todos los procedimientos experimentales. La figura 7 muestra el crecimiento de todos los hongos aislados sobre agar PDA.

**Figura 7**

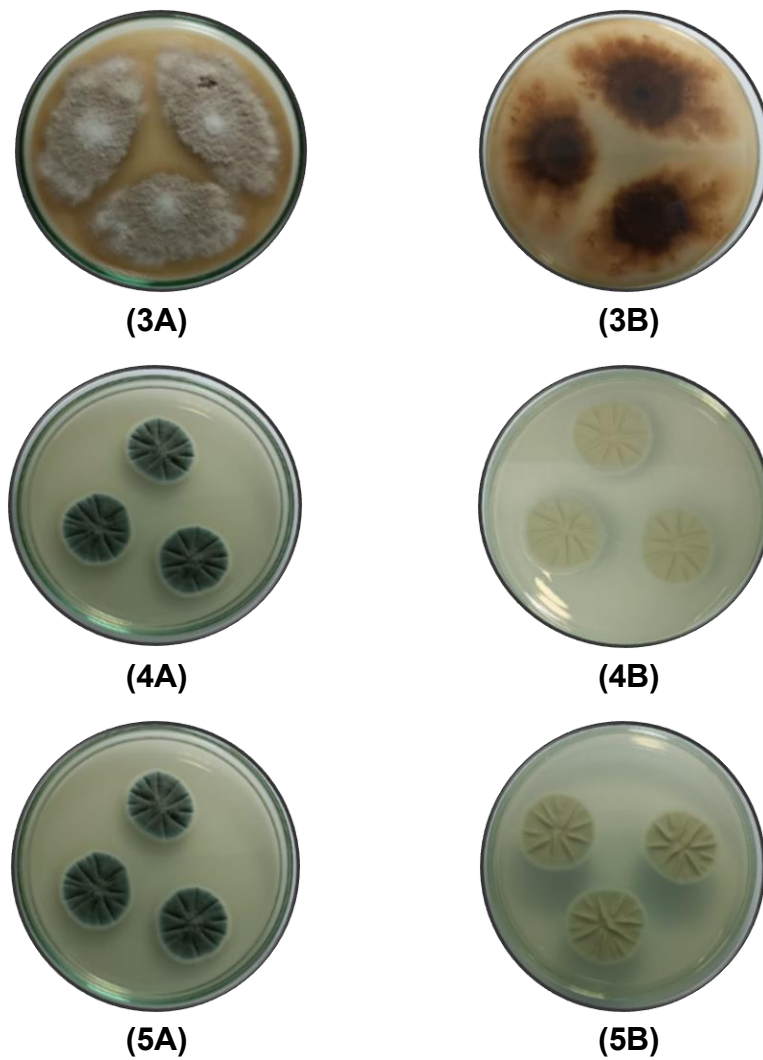
*Hongos aislados del compost en placas con PDA*



*Nota.* Vista anverso (1A, 2A) y reverso (1B, 2B) de las cepas FC-2, FC-3; respectivamente.

**Figura 7**

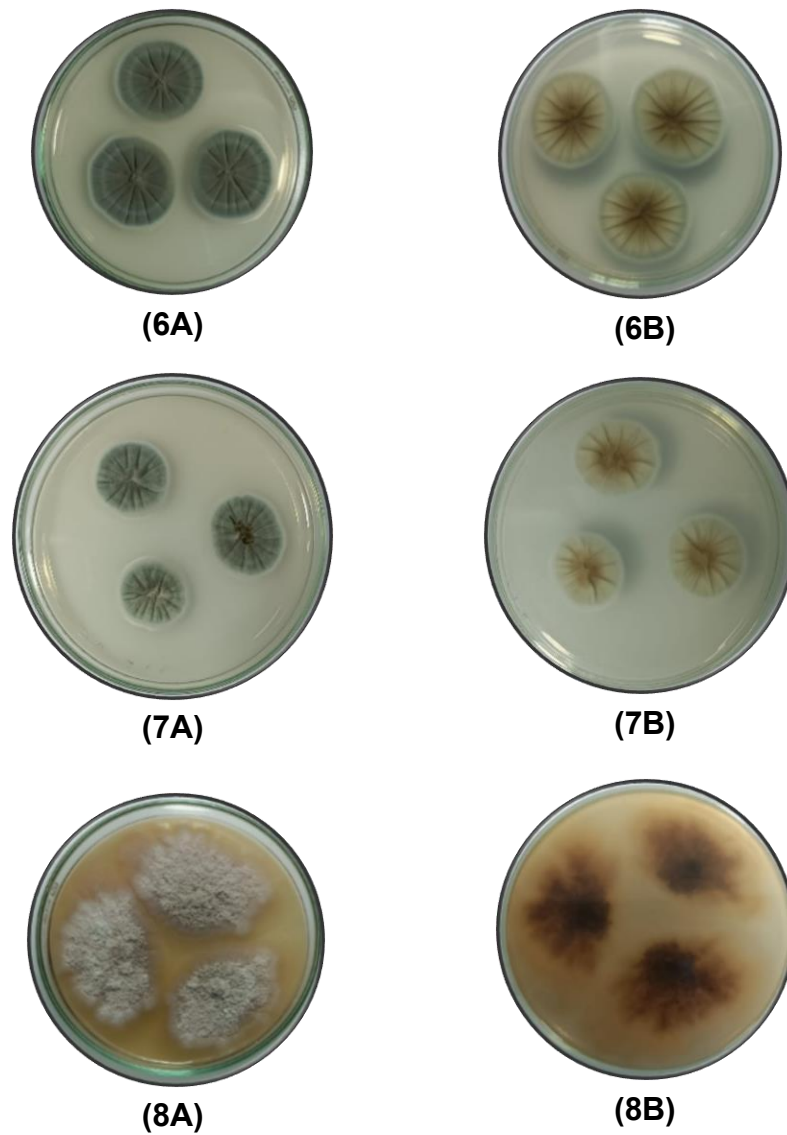
*Hongos aislados del compost en placas con PDA*



*Nota.* Vista anverso (3A, 4A, 5A) y reverso (3B, 4B, 5B) de los hongos FC-4, FC-5, FC-7; respectivamente.

**Figura 7**

*Hongos aislados del compost en placas con PDA*



*Nota.* Vista anverso (6A, 7A, 8A) y reverso (6B, 7B, 8B) de los hongos FC-8, FC-9, FC-13; respectivamente.

## **4.2. Selección cualitativa de hongos con capacidad celulolítica**

La evaluación de actividad celulolítica cualitativa tuvo como base de criterio de selección la hidrólisis de CMC, es decir, la visualización de halos claros alrededor de las colonias en estudio usando el sistema de difusión en placas con agar CMC como se observa su crecimiento en el Anexo 4. Esto permitió la obtención de promedios de índices enzimáticos.

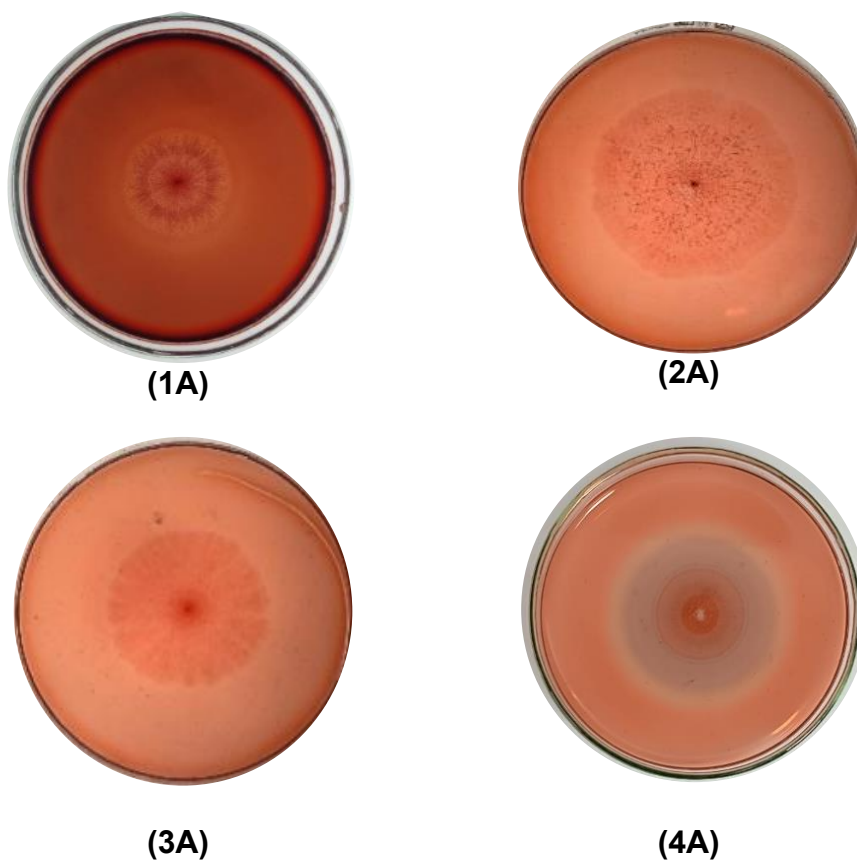
El primer criterio de selección se centró en el índice enzimático; se seleccionaron aquellos hongos que mostraron valores elevados para llevar a cabo el estudio de parámetros de crecimiento. Estos parámetros incluyeron la influencia del pH y la influencia de la temperatura.

### **4.2.1 Índice de hidrólisis enzimático de hongos**

Los hongos presentaron halos de hidrólisis con distintos diámetros indicando la presencia de degradación de CMC. Los valores de los diámetros de hidrólisis (expresados en milímetros) de cada hongo, se muestran en las Tabla 27 y 28, y fueron utilizados para calcular el índice de hidrólisis enzimático (Anexo 4).

**Figura 8**

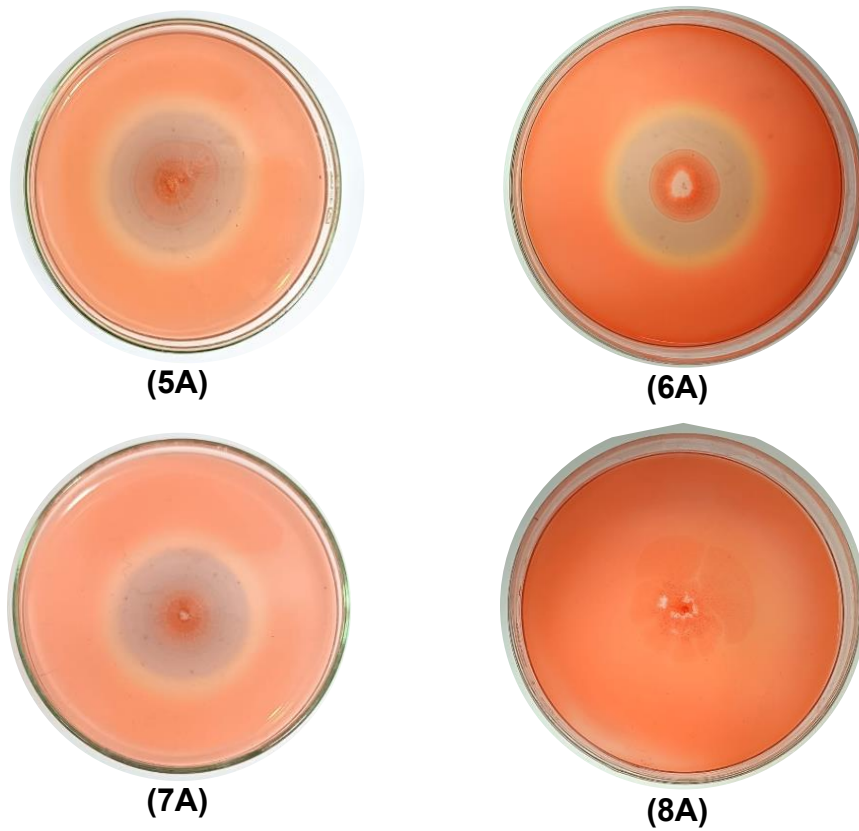
*Revelado de celulasas con rojo de congo 0,1 %*



*Nota.* Vista anverso 1A, 2A, 3A, 4A, (cepas FC-2, FC-3, FC-4, FC-5, respectivamente).

**Figura 8**

*Revelado de celulasas con rojo de congo 0,1 %*



*Nota. Vista anverso 5A, 6A, 7A, 8A, (cepas FC-7, FC-8, FC-9, FC-13, respectivamente).*

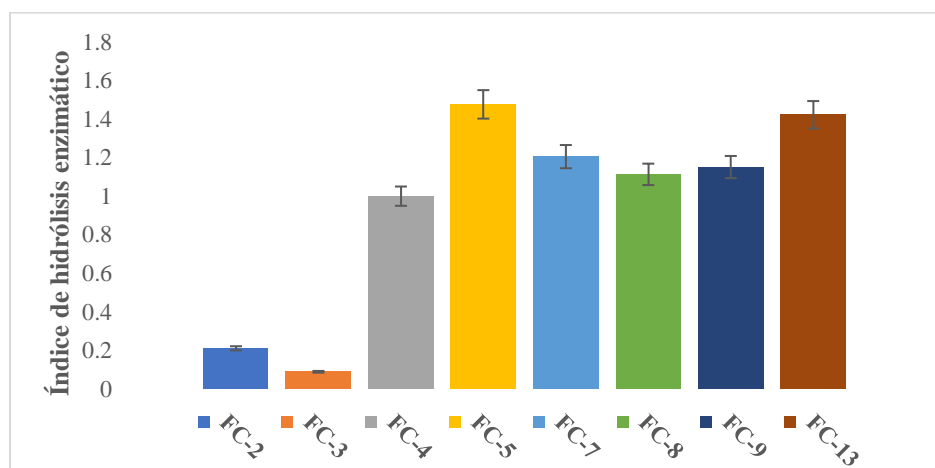
**Tabla 8***Índice de hidrólisis enzimático de hongos aislados del compost*

<b>Hongo</b>	<b>Índice de hidrólisis enzimático</b>				<b>Desviación estándar (DS)</b>	<b>Coefficiente de Variación (CV)</b>
	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>Promedio</b>		
FC-2	0,200	0,333	0,100	0,211	0,117	0,5545
FC-3	0,067	0,067	0,133	0,089	0,038	0,4270
FC-4	0,091	0,182	0,100	0,124	0,050	0,4032
FC-5	1,481	1,519	1,429	1,476	0,045	0,0305
FC-7	1,286	1,091	1,238	1,205	0,102	0,0846
FC-8	1,034	1,192	1,111	1,113	0,079	0,0710
FC-9	1,120	1,167	1,167	1,151	0,027	0,0235
FC-13	1,429	1,429	1,409	1,422	0,011	0,0077

De la figura 8 se observa que hubo presencia de halos visibles en las placas 4A, 5A, 6A, 7A y 8A, que corresponden a los hongos FC-5, FC-7, FC-8, FC-9 y FC-13 respectivamente, evidenciándose así visiblemente la actividad celulolítica. Esto se representa en la Tabla 8 al determinar el índice enzimático.

### Figura 9

*Índice enzimático de hongos aislados del compost*



En la figura 9, se observa que el mayor valor de índice enzimático fue de 1,476 para el hongo FC-5 y el valor más bajo fue de 0,211 para FC-2. Los hongos FC-5, FC-7, FC-9, FC-13 presentaron valores de índice enzimático superior a 1, mientras que los hongos FC-2, FC-3 y FC-4 tienen valores de índice enzimático inferiores a 0,3. Esto permite visualizar la capacidad celulolítica de unos hongos respecto a otros hongos aislados de la fase termófila del compost.

Los valores de la Tabla 8 se compararon mediante la prueba de Duncan con objeto de separar grupos significativamente diferentes. Se establecieron las

hipótesis y su respectivo análisis de varianza, donde H0: Los potenciales celulíticos expresados como el valor del índice enzimático de los hongos aislados son iguales. H1: Al menos un hongo presenta un valor de índice enzimático que es diferente al resto.

En la Tabla 29 (Anexo 11), como el valor  $p < 0,05$ , entonces se rechaza la H0 y se acepta la H1. Es decir, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Índice Enzimático de los hongos. Por lo tanto, se ejecutó una prueba de Duncan.

Se obtuvieron 3 grupos homogéneos entre los cuales existe diferencia significativa entre las medias de índice enzimático con un nivel confianza del 95% (Tabla 30). Mientras que dentro de cada grupo no hay diferencia significativa entre los hongos que componen dicho grupo.

Se observa el primer grupo (hongos FC-2, FC-3 y FC-4) presentaron valores de índice enzimático inferiores a 0,211. El segundo grupo de hongos (FC-7, FC-8 y FC-9) tuvieron valores de índice enzimático comprendidos entre 1,113 y 1,205. El tercer grupo presentó valores de índice enzimático altos como 1,422 para el hongo FC-13 y 1,476 para el hongo FC-5.

De acuerdo con la prueba de Duncan, el hongo FC-5 y FC-13 componen un solo grupo y presentaron los mayores valores promedio de Índice enzimático y por

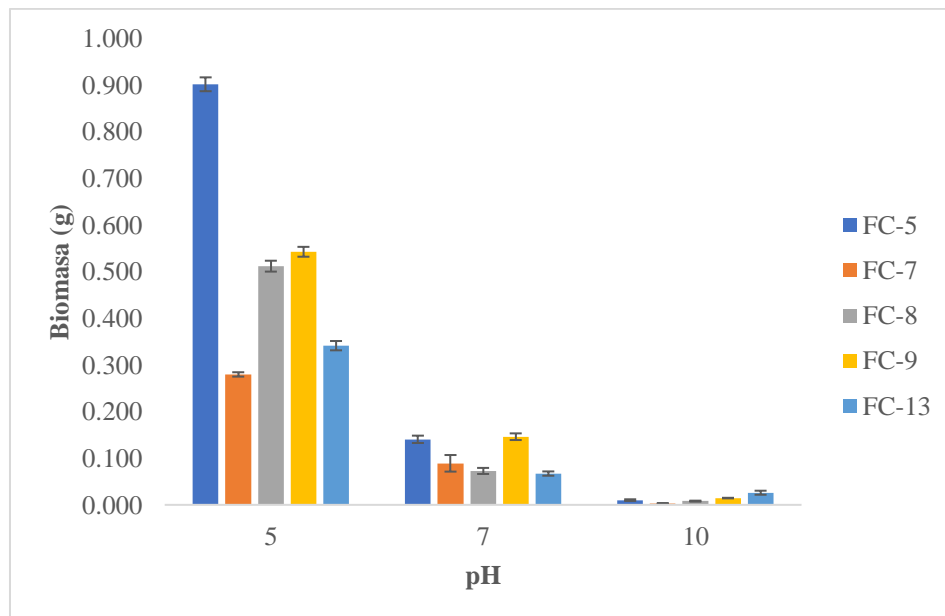
lo tanto sugiere que presenta mayor potencial para degradar celulosa en las condiciones ensayadas. Dichas cepas se utilizaron para los ensayos fermentativos.

#### **4.2.2 Influencia del pH en el crecimiento de hongos celulolíticos**

La Tabla 9 exhibe los resultados de la comparación del crecimiento de los 5 hongos seleccionados a pH de 5, 7 y 10, donde su crecimiento expresado en biomasa permite conocer cuál de ellos presentó un valor medio mayor que los demás.

**Tabla 9***Influencia del pH en el crecimiento de hongos celulolíticos*

pH	Hongo	Biomasa (g)				Desviación estándar (DS)	Coeficiente de Variación (CV)
		I	II	III	Promedio		
pH 5	FC-5	0,9058	0,8846	0,9132	0,9012	0,015	0,016
	FC-7	0,2838	0,2745	0,2801	0,2795	0,005	0,017
	FC-8	0,5145	0,4986	0,5213	0,5115	0,012	0,023
	FC-9	0,5437	0,5521	0,5311	0,5423	0,011	0,019
	FC-13	0,3437	0,3301	0,3495	0,3411	0,010	0,029
pH 7	FC-5	0,1468	0,1316	0,1429	0,1404	0,008	0,0560
	FC-7	0,0834	0,0758	0,1096	0,0890	0,018	0,2000
	FC-8	0,0792	0,0660	0,0734	0,0727	0,007	0,0900
	FC-9	0,1538	0,1398	0,1444	0,1460	0,007	0,0490
	FC-13	0,0681	0,062	0,0715	0,0670	0,005	0,0680
pH 10	FC-5	0,0085	0,0098	0,0120	0,0101	0,002	0,1750
	FC-7	0,0018	0,0029	0,0038	0,0028	0,001	0,3540
	FC-8	0,0072	0,0091	0,0075	0,0079	0,001	0,1290
	FC-9	0,0139	0,0151	0,0145	0,0145	0,001	0,0410
	FC-13	0,0217	0,0303	0,0259	0,0260	0,004	0,1660

**Figura 10***Influencia del pH en el crecimiento de hongos celulolíticos*

En la figura 10 se observa que el hongo FC-5 presentó el mayor valor de producción de biomasa siendo esta de 0,9012 g en el medio Caldo papa dextrosa ajustado a pH 5. El menor valor de producción de biomasa fue 0,0028 g del hongo FC-7 en el medio a pH 10.

Los hongos FC-5, FC-7, FC-8, FC-9 y FC-13 tuvieron una mayor producción de biomasa en el medio de cultivo a un pH de 5. Los menores valores de biomasa pesada expresada en gramos se obtuvieron cuando los hongos se inocularon en un medio a pH 10.

Cuando los hongos se incubaron en un medio ajustado a pH 7 los valores de biomasa fueron inferiores a los obtenidos cuando crecieron en un medio ajustado a

pH 5 en todos los casos de hongos evaluados. Cabe resaltar que cuando los hongos FC-5, FC-7, FC-8, FC-9 y FC-13 fueron sembrados en un medio a pH 10, el hongo FC-13 fue el que presentó el mayor valor de biomasa producida siendo éste de 0,0260 g.

Estos valores de la Tabla 9 se compararon mediante la prueba de Duncan con objeto de separar grupos significativamente diferentes. Se establecieron las hipótesis y su respectivo análisis de varianza. H0: El crecimiento de los hongos celulíticos expresados como biomasa son iguales a cualquier valor de pH. H1: Al menos un pH favorece el crecimiento del hongo con un valor de biomasa que es diferente al resto.

En la Tabla 31 (Anexo 11), como valor  $p < 0,05$  se rechaza H0 y se acepta H1. Es decir, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de los pH donde crecieron las cepas de hongo. Por lo tanto, se ejecutó una prueba de Duncan.

Se obtuvieron 3 grupos homogéneos entre los cuales existe diferencia significativa entre las medias del pH con un nivel confianza del 95% (Tabla 32). Mientras que dentro de cada grupo no hay diferencia significativa entre los hongos que componen dicho grupo.

De acuerdo con la prueba de Duncan, los hongos que crecen a pH 5 componen un solo grupo y presentaron los mayores valores promedio de la

influencia del pH en el crecimiento y por lo tanto sugiere que presenta mayor potencial para ser utilizado como parámetro de crecimiento en las condiciones ensayadas.

#### **4.2.3 Influencia de la temperatura en el crecimiento de hongos celulolíticos**

Al incubar los hongos durante 5 días en matraces con medio Caldo papa dextrosa a pH 5 a distintas temperaturas: 40°C, 50°C, 60°C, 70°C y 80°C. Se obtuvieron los siguientes valores de biomasa producido como se indica en la tabla 10.

**Tabla 10***Influencia de la temperatura en el crecimiento de hongos celulolíticos*

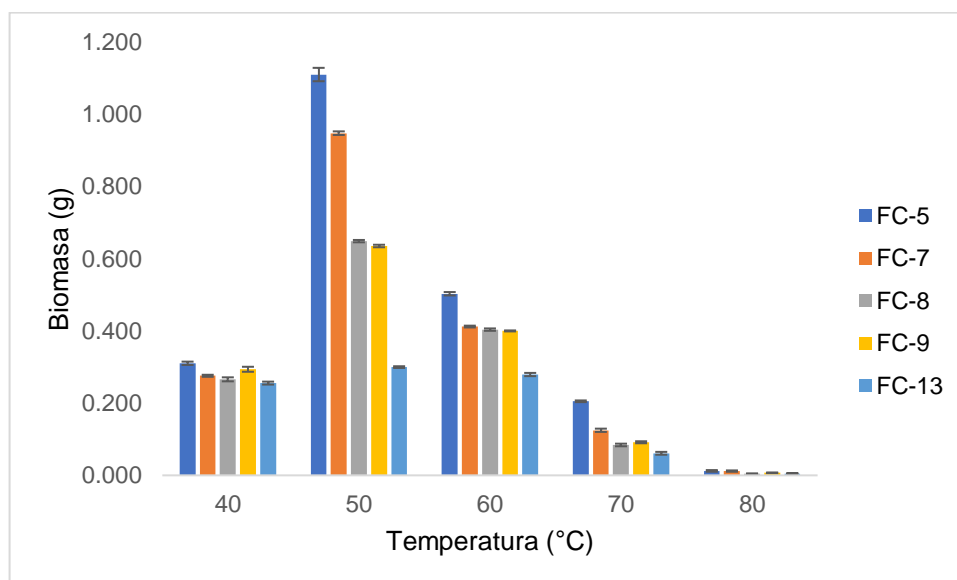
Temperatura (°C)	Hongo	Biomasa (g)				Desviación estándar (DS)	Coeficiente de Variación (CV)
		I	II	III	Promedio		
40	FC-5	0,3122	0,3049	0,3135	0,3102	0,005	0,015
	FC-7	0,2788	0,2736	0,2744	0,2756	0,003	0,010
	FC-8	0,2689	0,2691	0,2594	0,2658	0,006	0,021
	FC-9	0,2923	0,2875	0,3011	0,2936	0,007	0,023
	FC-13	0,2588	0,2564	0,2509	0,2554	0,004	0,016
50	FC-5	1,129	1,092	1,108	1,1097	0,019	0,017
	FC-7	0,9496	0,9416	0,9508	0,9473	0,005	0,005
	FC-8	0,6455	0,6478	0,6519	0,6484	0,003	0,005
	FC-9	0,6378	0,6359	0,631	0,6349	0,004	0,006
	FC-13	0,3021	0,2995	0,2974	0,2997	0,002	0,008
60	FC-5	0,6026	0,6075	0,5981	0,6027	0,005	0,009
	FC-7	0,4146	0,4097	0,4114	0,4119	0,002	0,006
	FC-8	0,4023	0,4072	0,4009	0,4035	0,003	0,008
	FC-9	0,3998	0,3985	0,4012	0,3998	0,001	0,003
	FC-13	0,2835	0,2746	0,2793	0,2791	0,004	0,016

Temperatura (°C)	Hongo	Biomasa (g)				Desviación estándar (DS)	Coeficiente de Variación (CV)
		I	II	III	Promedio		
70	FC-5	0,2031	0,2044	0,2076	0,2050	0,002	0,011
	FC-7	0,1249	0,1202	0,1292	0,1248	0,005	0,036
	FC-8	0,0864	0,0799	0,0859	0,0841	0,004	0,043
	FC-9	0,0912	0,0945	0,089	0,0916	0,003	0,030
	FC-13	0,0648	0,0569	0,0613	0,0610	0,004	0,065
80	FC-5	0,0122	0,0101	0,0146	0,0123	0,002	0,1830
	FC-7	0,0109	0,0105	0,0139	0,0118	0,002	0,1580
	FC-8	0,0045	0,0054	0,0036	0,0045	0,001	0,2000
	FC-9	0,0078	0,0071	0,0058	0,0069	0,001	0,1470
	FC-13	0,0063	0,0051	0,004	0,0051	0,001	0,2240

La Tabla 10 detalla los resultados del crecimiento de los 5 hongos seleccionados a 5 temperaturas diferentes: 40°C, 50°C, 60°C, 70°C y 80°C; los valores obtenidos biomasa permitieron conocer si son capaces de crecer a temperaturas similares o más altas de acuerdo con lo registrado durante el muestreo.

**Figura 11**

*Influencia de la temperatura en el crecimiento de hongos celulolíticos*



En la figura 11 se exhibe que el hongo FC-5 tuvo el mayor valor de biomasa producida cuando se incubó a 50°C el cual fue de 1,1097 g. La temperatura a la cual se registró el menor valor de biomasa producida fue a 80°C, siendo la biomasa producida de 0,0045 g para el hongo FC-8.

Los hongos FC-5, FC-7, FC-8, y FC-9 presentaron valores de biomasa superiores a 0,6 g; cuando fueron incubados a una temperatura de 50°C. También se observa que el hongo FC-13 presentó valores de biomasa de 0,2554; 0,2997 y 0,2791 g cuando se incubó a temperaturas de 40°C, 50°C y 60°C respectivamente.

Cuando los hongos FC-5, FC-7, FC-8, FC-9 y FC-13 se incubaron a temperaturas de 60°C los valores de biomasa empezaron a disminuir y más aún cuando los hongos se incubaron a 70°C. Los hongos cuando fueron incubados a temperaturas de 80°C presentaron los valores más bajos de biomasa producida.

Estos valores de la Tabla 10 se compararon mediante la prueba de Duncan con objeto de separar grupos significativamente diferentes. Se establecieron las hipótesis y su respectivo análisis de varianza (Tabla 33). Donde H0: El crecimiento de los hongos celulíticos expresados como biomasa son iguales a cualquier valor de Temperatura. Y H1: Al menos una temperatura favorece el crecimiento del hongo con un valor de biomasa que es diferente al resto.

En la Tabla 33 (Anexo 11), como valor  $p < 0,05$  se rechaza H0 y se acepta H1. Es decir, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de las temperaturas donde crecieron las cepas de hongo. Por lo tanto, se ejecutó una prueba de Duncan.

Se obtuvieron 2 grupos homogéneos entre los cuales existe diferencia significativa entre las medias de la temperatura con un nivel confianza del 95%

(Tabla 34). Mientras que dentro de cada grupo no hay diferencia significativa entre los hongos que componen dicho grupo.

De acuerdo con la prueba de Duncan, los hongos que crecen a 50°C componen un solo grupo y presentaron los mayores valores promedio del efecto de la temperatura en el crecimiento y por lo tanto sugiere que presentan mayor potencial para ser utilizado a la hora de evaluar un crecimiento óptimo.

#### **4.2.4 Capacidad de crecimiento de los hongos celulolíticos**

En la Tabla 11 se muestra los resultados del crecimiento radial de los 5 hongos seleccionados con capacidad celulolítica, su crecimiento fue en medio Agar PDA a pH 5 e incubados a 50°C por 8 días.

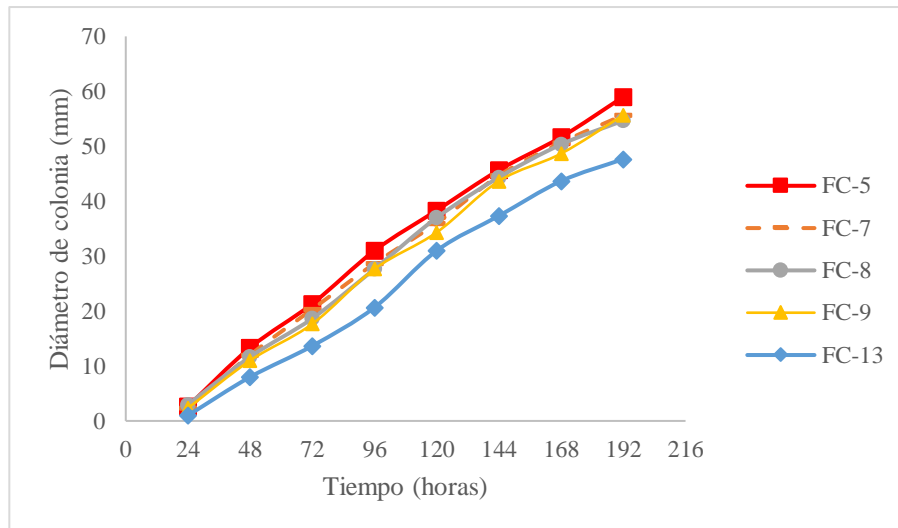
**Tabla 11***Crecimiento radial de hongos celulolíticos aislados del compost*

Hongo	Tiempo de incubación (horas)	Diámetro (mm)				Desviación estándar (DS)	Coeficiente de Variación (CV)
		I	II	III	Promedio		
FC-5	24	3	3	2	2,67	0,58	0,217
	48	13	13	14	13,3	0,58	0,043
	72	21	22	21	21,3	0,58	0,027
	96	30	31	32	31,0	0,1	0,032
	120	38	38	39	38,3	0,58	0,015
	144	46	46	45	45,7	0,58	0,013
	168	52	51	52	51,7	0,58	0,011
	192	59	59	59	59,0	0,00	0,000
FC-7	24	2	2	3	2,3	0,58	0,247
	48	12	12	12	12,0	0,00	0,000
	72	20	20	21	20,3	0,58	0,028
	96	29	28	29	28,7	0,58	0,020
	120	36	36	36	36,0	0,00	0,000
	144	45	44	45	44,7	0,58	0,013
	168	51	51	50	50,7	0,58	0,011
	192	56	55	56	55,7	0,58	0,010
FC-8	24	3	3	3	3	0,00	0,000
	48	12	11	12	11,7	0,58	0,049
	72	19	18	19	18,7	0,58	0,031
	96	28	26	29	27,7	0,58	0,055
	120	37	37	37	37,0	0,00	0,000
	144	44	44	45	44,3	0,58	0,013
	168	50	51	50	50,3	0,58	0,011
	192	55	55	54	54,7	0,58	0,011

Hongo	Tiempo de incubación (horas)	Diámetro (mm)				Desviación estándar (DS)	Coeficiente de variación (CV)
		I	II	III	Promedio		
FC-9	24	2	2	3	2,3	0,58	0,247
	48	11	11	11	11,0	0,00	0,000
	72	18	17	18	17,7	0,58	0,033
	96	28	28	27	27,6	0,58	0,021
	120	35	34	34	34,3	0,58	0,017
	144	44	44	43	43,7	0,58	0,013
	168	49	49	48	48,7	0,58	0,012
	192	56	56	55	55,7	0,58	0,010
FC-13	24	1	1	1	1,0	0,00	0,000
	48	8	8	8	8,0	0,00	0,000
	72	14	13	14	13,7	0,58	0,042
	96	21	21	20	20,7	0,58	0,028
	120	31	31	31	31,0	0,00	0,000
	144	38	37	37	37,3	0,58	0,015
	168	44	44	43	43,7	0,58	0,013
	192	48	47	48	47,7	0,58	0,012

**Figura 12**

*Crecimiento de hongos celulolíticos*



En la figura 12, se observa que la cepa FC-5 presentó mayor diámetro colonial de crecimiento respecto al resto de hongos (FC-7, FC-8, FC-9 y FC-13), llegando casi a los 60 mm en un tiempo de incubación de 8 días a las condiciones óptimas de 50°C y a pH 5 que fueron determinadas anteriormente.

La cepa FC-13 durante los 8 días evaluación presentó valores de diámetro de crecimiento menores al resto de hongo en cada uno de los días medido. Al octavo día se registró un valor de 47 mm aproximadamente. Según la figura 12, los hongos FC-7, FC-8 y FC-9 tuvieron valores de crecimiento radial muy similares o cercanos durante los 8 días evaluados.

### **4.3. Identificación de cepas fúngicas con mayor actividad celulolítica**

#### **4.3.1 Caracterización macroscópica**

Se seleccionaron las cepas FC-5 y FC-13 con actividad de celulasa por la presencia de zonas de hidrólisis determinada cualitativamente.

Al evaluar su crecimiento de la cepa FC-5 después de 5 días de incubación a 50°C se obtuvo un diámetro promedio de la colonia en Agar Extracto de Malta (MEA) 55 - 60 mm; en Agar Sacarosa Extracto de levadura (YES), 40 - 45 mm; Agar autolisado de levadura Czapek (CYA), 45-50 mm; en PDA, 40-50 mm.

En el medio PDA las colonias fueron de color verde oscuro con micelios incoloros y carecían de exudados y pigmentos solubles. El color del reverso era gris claro. Las colonias en MEA eran de color gris, rugosas, con micelios incoloros y bordes blancos; carecían de exudados y pigmentos solubles. El reverso de la colonia era marrón oscuro. En YES las colonias eran de color verde oscuro con bordes blancos, tienen micelios incoloros. En CYA las colonias eran verde cian con bordes blancos y micelios incoloros. No mostraban presencia de exudados poca pigmentación soluble. El reverso de las colonias color verde amarillento como se muestra en la figura 27 (Anexo 5). La superficie de las colonias era rugosa y otras tenían hilos hifales visibles que surgían de la colonia.

Para la cepa FC-13 se obtuvo un diámetro promedio de la colonia en Agar Extracto de Malta (MEA) 25 - 30 mm; en Agar Sacarosa Extracto de levadura (YES), 45 - 50 mm; en Agar Autolisado de levadura Czapek (CYA), 40-45 mm; en PDA, 40-45 mm. En el medio PDA las colonias fueron de color marrón grisáceo con micelio algodonoso blanco y carecían de exudados y pigmentos solubles. El color del reverso era gris oscuro. Las colonias en MEA eran de color blanco, aterciopelado, con micelios incoloros y bordes beige irregulares; carecían de exudados y pigmentos solubles. El reverso de la colonia era beige claro. En YES y CYA las colonias eran de color blanco con bordes irregulares, tienen micelios blancos. No mostraban presencia de exudados. El reverso de las colonias color gris amarillento como se muestra en la figura 27 (Anexo 5). La superficie y textura de las colonias era rugosa y aterciopelada.

**Tabla 12***Características macroscópicas de las cepas FC-5 y FC-13*

<b>Cepa</b>	<b>Medio de cultivo</b>	<b>Borde</b>	<b>Color</b>	<b>Forma</b>	<b>Superficie</b>	<b>Textura</b>	<b>Pigmentación</b>
FC-5	PDA	Lobulado	Verde grisáceo	Circular	Rugosa y radiada	Aterciopelada	Anverso y reverso no difusible
FC-13	PDA	Rizoide	Marrón grisáceo	Irregular	Elevada y extendida	Aterciopelada	Anverso no difusible y reverso difusible

### 4.3.2 Caracterización microscópica

Las características observadas de las cepas F-5 y FC-13 se muestran a modo resumen en la Tabla 13, así como el promedio de las medidas. En la figura 13 y 14 se aprecia las principales estructuras (hifas, conidióforo, fiálide y conidios) de dichas cepas.

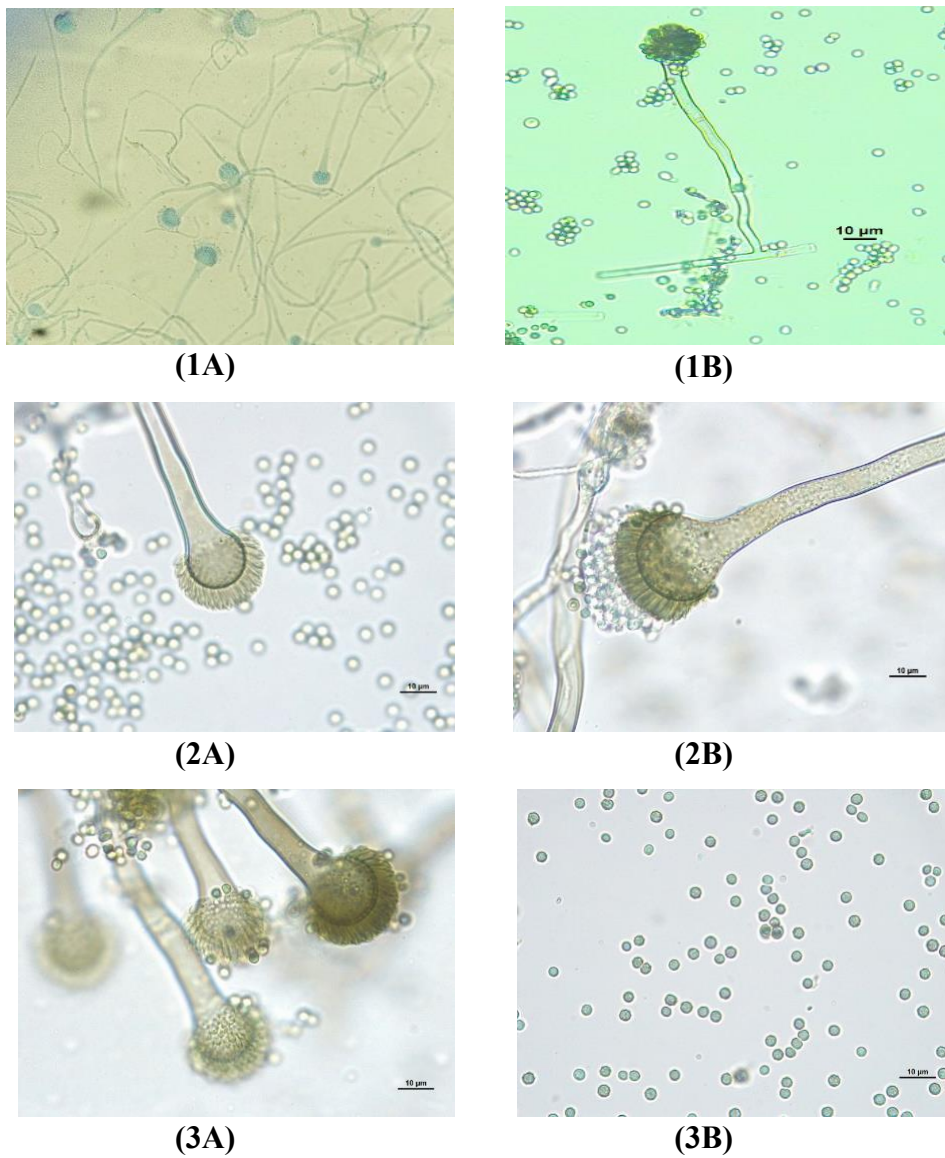
**Tabla 13**

*Características microscópicas de las cepas FC-5 y FC-13*

Estructura	CEPAS FÚNGICAS			
	FC-5		FC-13	
	Forma	Tamaño	Forma	Tamaño
<b>Conidióforo</b>	Corto	300 $\mu\text{m}$	Largo	350 $\mu\text{m}$
<b>Métula</b>	-	-	Cilíndrica	6 x 3 $\mu\text{m}$
<b>Fiálide</b>	Botella alargada	9 x 3,5 $\mu\text{m}$	Matraz	7 x 2,5 $\mu\text{m}$
<b>Conidios</b>	Globular de pared lisa hialina	3 x 2,5 $\mu\text{m}$	Globular de pared lisa hialina	2 x 2,2 $\mu\text{m}$

**Figura 13**

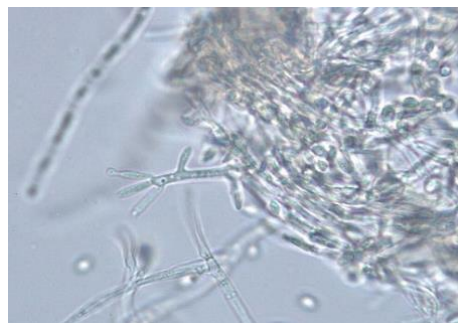
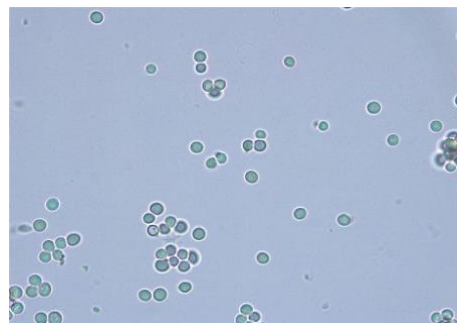
*Fotografías del campo microscópico del hongo FC-5.*



*Nota.* Estructuras microscópicas: Hifas tabicadas (1A), conidióforo (1B) y (2A); fiálide (2B) y conidios (3A) y (3B).

**Figura 14**

*Fotografías del campo microscópico del hongo FC-13.*

**(1A)****(1B)****(2A)****(2B)**

*Nota.* Estructuras microscópicas: Hifas tabicadas (1A); conidióforo (1B);  
métula (2A); fiálide (2A) y conidios (2B).

### 4.3.3 Identificación molecular

#### 4.3.3.1 Extracción de ADN genómico

El ADN obtenido de las cepas FC-5 y FC-13 presentó una relación 260/280 nm de 1,95 y 1,89 respectivamente; y una concentración media de 2,497 ng/ $\mu$ L y 13,801 ng/ $\mu$ L.

**Tabla 14**

*Concentración y calidad del ADN extraído.*

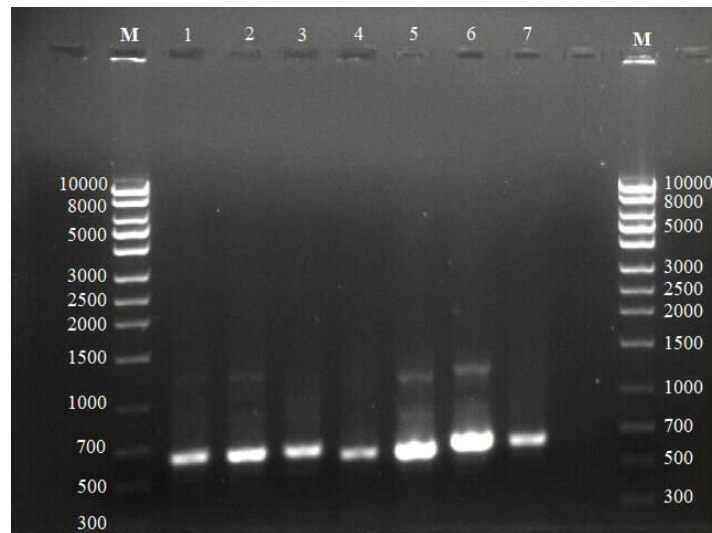
<b>Cepa</b>	<b>260</b>	<b>280</b>	<b>260/280</b>	<b>ng/<math>\mu</math>L</b>	<b>Promedio</b>	<b>Coefficiente de Variación</b>
FC-5	0,003	0,001	1,931	2,671	2,4975	0,0982
	0,006	0,003	1,970	2,324		
FC-13	0,013	0,007	1,914	12,542	13,801	0,1289
	0,015	0,008	1,882	15,060		

#### 4.3.3.2 Amplificación de productos por PCR

El ADN extraído se empleó para la amplificación de las regiones ITS1 e ITS4 mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando cebadores específicos universales. En la Figura 15 se muestra el producto de amplificación obtenido, el cual presenta un tamaño aproximado de 500 – 700 pares de bases (pb).

**Figura 15**

*Fotografía de la corrida electroforética de los productos de PCR.*



*Nota.* M: Marcador de peso; 1-4: Productos amplificados de la cepa FC-5; 5-6: Productos amplificados hongo FC-13.

**Tabla 15**

*Concentración y calidad de productos PCR.*

Cepa	260	280	260/280	ng/ $\mu$ L	Promedio	Coefficiente de Variación
FC-5	0,567	0,320	1,770	374,036	371,739	0,0087
	0,560	0,316	1,773	369,443		
FC-13	0,508	0,285	1,785	335,521	342,297	0,0280
	0,529	0,296	1,789	349,074		

En la Tabla 15, se observa que mediante la determinación espectrofotométrica de la concentración de productos PCR se obtuvo concentraciones promedio de 371,74 ng/uL y 342,29 ng/uL.

#### **4.3.3.3 Procesamiento de secuencias y análisis bioinformático**

##### **Cepa FC-5**

La secuencia consenso de la región ITS de la cepa FC-5 tuvo una longitud de 531 nt. Esta secuencia fue consultada en la base de datos del NCBI para identificar las regiones más similares entre las secuencias analizadas. La Tabla 16 muestra las primeras 15 secuencias con mayor porcentaje de identidad respecto a la secuencia en consulta correspondiente al alineamiento local ejecutado.

**Tabla 16**

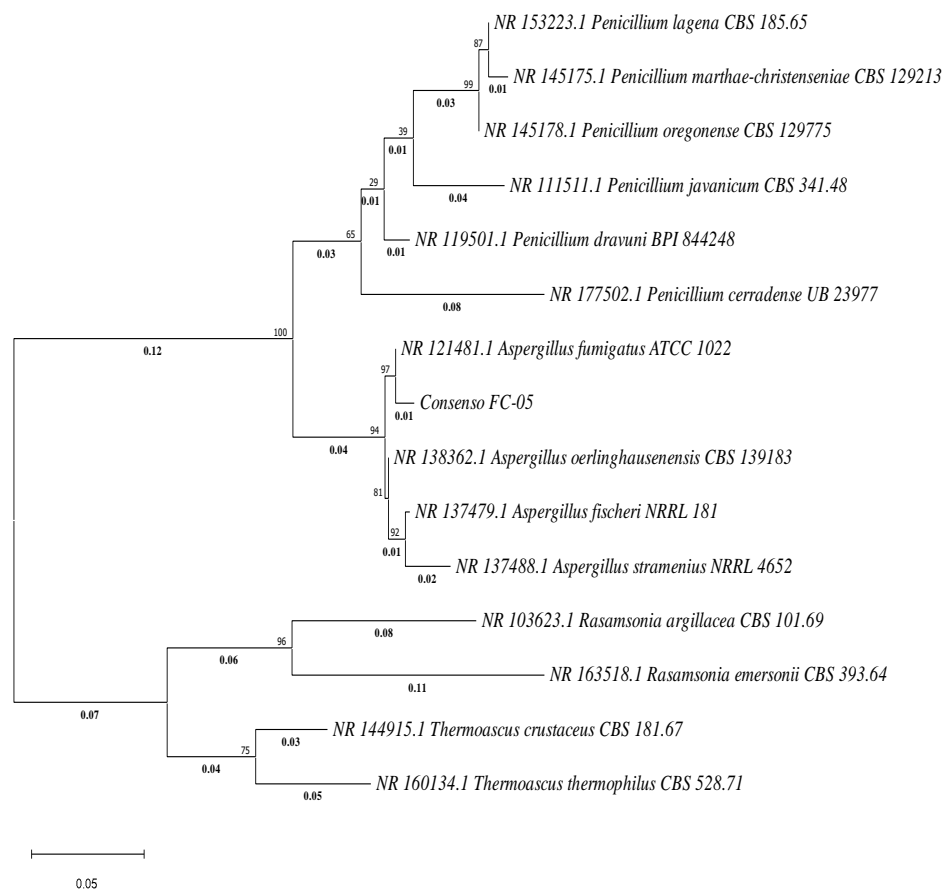
*Alineamiento local básico de la secuencia de la región ITS de la cepa FC-5*

Descripción	Max Score	Total Score	Cobertura de la consulta	Valor E	% Identidad	Longitud secuencia accedida	Código de acceso
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 1022	976	976	100%	0.0	99,81%	707	NR_121481.1
<i>Aspergillus oerlinghausenensis</i> CBS 139183	946	946	100%	0.0	98,87%	691	NR_138362.1
<i>Aspergillus fischeri</i> NRRL 181	924	924	99%	0.0	98,48%	614	NR_137479.1
<i>Aspergillus fumisynnematus</i> IFM 42277	893	893	95%	0.0	98,43%	505	NR_136948.1
<i>Aspergillus lentulus</i> NRRL 35552	918	918	99%	0.0	98,29%	614	NR_135407.1
<i>Aspergillus novofumigatus</i> CBS 117520	922	922	100%	0.0	98,12%	728	NR_171617.1
<i>Aspergillus spinosus</i> NRRL 5034	907	907	99%	0.0	97,91%	614	NR_137489.1
<i>Aspergillus udagawae</i> CBM FA-0702	880	880	95%	0.0	97,85%	510	NR_137442.1
<i>Aspergillus aureolus</i> NRRL 2244	905	905	99%	0.0	97,73%	618	NR_135405.1
<i>Aspergillus laciniosus</i> KACC 41657	902	902	99%	0.0	97,72%	553	NR_137443.1
<i>Aspergillus frankstonensis</i> CBS 142233	808	808	88%	0.0	97,67%	474	NR_154738.1
<i>Aspergillus arcoverdensis</i> JCM 19878	909	909	100%	0.0	97,57%	579	NR_151816.1
<i>Aspergillus viridinutans</i> NRRL 4365	902	902	99%	0.0	97,55%	619	NR_135409.1
<i>Aspergillus wyomingensis</i> CCF 4417	900	900	99%	0.0	97,54%	618	NR_137517.1
<i>Aspergillus felis</i> CBS 130245	904	904	100%	0.0	97,38%	749	NR_138341.1

El árbol filogenético fue construido utilizando el método estadístico de Máxima Verosimilitud. Se utilizó el modelo de sustitución Tamura - 3 parámetros con una distribución gamma y un análisis de Bootstrap con 500 réplicas para evaluar el soporte del árbol (Figura 16).

### Figura 16

*Árbol filogenético por método de Máxima Verosimilitud de la región de los espaciadores internos transcritos (ITS) de la cepa FC-5.*



### **Cepa FC-13**

La secuencia consenso de la región ITS de la cepa FC-13 tuvo una longitud de 654 nt. Esta secuencia fue consultada en la base de datos del NCBI para identificar las regiones más similares entre las secuencias analizadas. La Tabla 17 muestra las primeras 15 secuencias con mayor porcentaje de identidad respecto a la secuencia en consulta correspondiente al alineamiento local ejecutado.

**Tabla 17**

*Alineamiento local básico de la secuencia de la región ITS de la cepa FC-13*

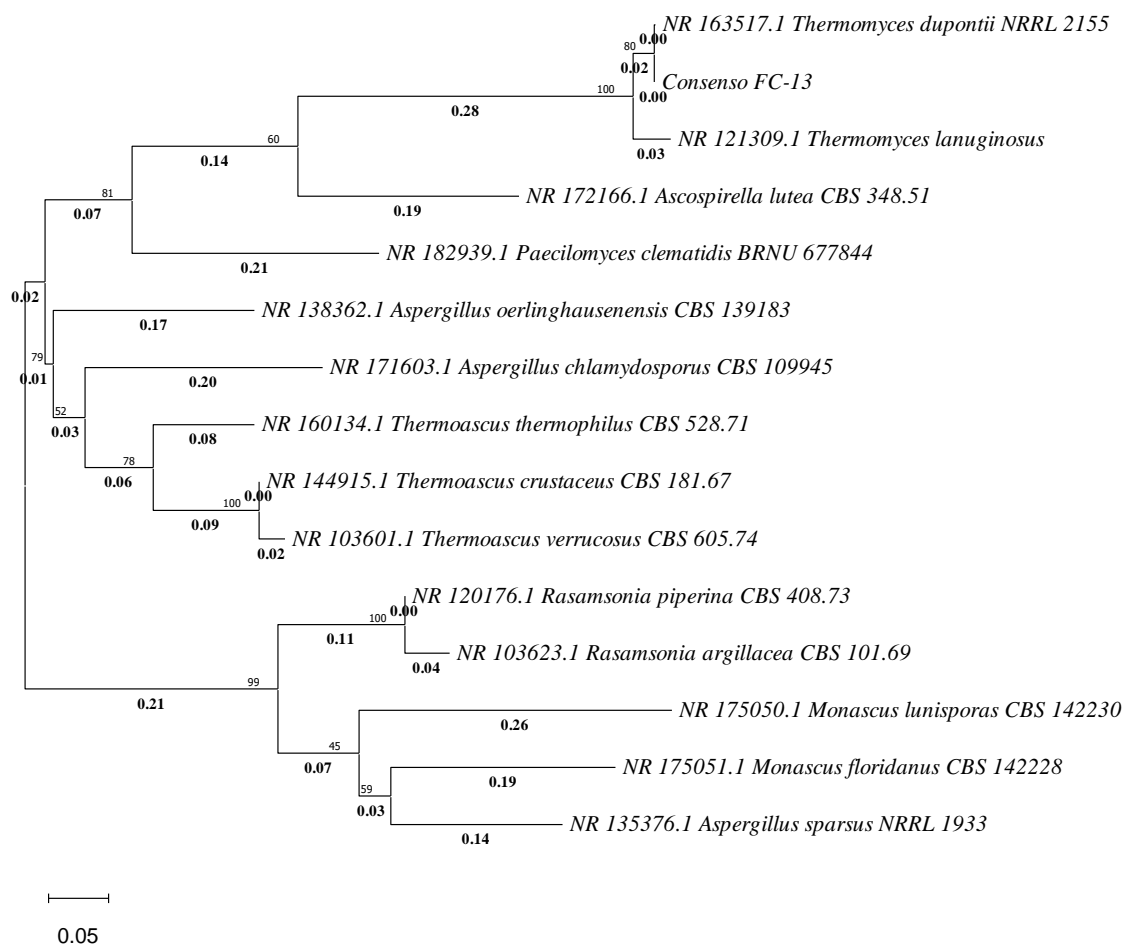
<b>Descripción</b>	<b>Max Score</b>	<b>Total Score</b>	<b>Cobertura de la consulta</b>	<b>Valor E</b>	<b>% Identidad</b>	<b>Longitud secuencia accedida</b>	<b>Código de acceso</b>
<i>Thermomyces dupontii</i> NRRL 2155	1161	1161	98%	0.0	99,84%	809	NR_163517.1
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	858	858	86%	0.0	95,74%	634	NR_121309.1
<i>Rasamsonia aegroticola</i> IHEM 22641	439	495	58%	4e-123	93,73%	461	NR_111447.1
<i>Paecilomyces divaricatus</i> CBS 284.48	425	536	55%	4e-119	93,68%	564	NR_145143.1
<i>Thermoascus verrucosus</i> CBS 605.74	425	565	66%	4e-119	93,68%	557	NR_103601.1
<i>Rasamsonia composticola</i> CGMCC 3.13669 ITS region	431	540	64%	8e-121	93,47%	569	NR_111632.1
<i>Paecilomyces variotii</i> CBS 101075 ITS region	427	534	62%	1e-119	93,31%	560	NR_130679.1
<i>Penicillium brocae</i> CBS 116113 ITS region	414	414	45%	1e-115	92,98%	501	NR_111868.1

<b>Descripción</b>	<b>Max score</b>	<b>Total score</b>	<b>Cobertura de la consulta</b>	<b>Valor E</b>	<b>% de identidad</b>	<b>Longitud secuencia accedida</b>	<b>Código de acceso</b>
<i>Aspergillus atacamensis</i> EX F-6660 ITS region	404	447	54%	1e-112	92,98%	531	NR_171601.1
<i>Paecilomyces zollerniae</i> CBS 374.70 ITS region	417	536	61%	9e-117	92,63%	561	NR_103602.1
<i>Penicillium tealii</i> BRIP 72734c ITS region	402	455	60%	4e-112	92,28%	631	NR_185747.1
<i>Aspergillus haitiensis</i> CBS 464.91 ITS region	402	402	45%	4e-112	92,28%	459	NR_137504.1
<i>Phialomyces macrosporus</i> CBS 430.64 ITS region	390	430	52%	1e-108	92,11%	523	NR_160098.1
<i>Aspergillus whitfieldii</i> CBS 143385 ITS region	400	500	65%	1e-111	91,99%	572	NR_156331.1

El árbol filogenético fue construido utilizando el método estadístico de máxima verosimilitud. Se utilizó el modelo de sustitución Tamura - 3 parámetros con una distribución gamma y un análisis de bootstrap con 500 réplicas para evaluar el soporte del árbol.

### Figura 17

*Árbol filogenético por método de Máxima Verosimilitud de la región de los espaciadores internos transcritos (ITS) de la cepa FC-13.*



#### **4.4 Producción de celulasa FC-5 y FC-13**

Las cepas FC-5 y FC-13 presentaron resultados notablemente altos en cuanto a la actividad celulolítica según la determinación del índice enzimático. Los ensayos de crecimiento para la cepa FC-5, lo hacen candidato óptimo para realizar los ensayos de fermentación a distintos sustratos.

Se logró obtener el extracto crudo de los medios fermentativos utilizando como sustrato los residuos vegetales: mazorca de maíz, hojas de betarraga y hojas de perejil. Dicho extracto crudo se utilizó para la determinación de proteínas y actividad enzimática.

##### **4.4.1 Determinación de proteínas totales**

La cantidad de proteínas totales presentes en los extractos crudos obtenidos se observan en la tabla 18, donde se utilizaron distintos sustratos en el medio fermentativo.

**Tabla 18***Concentración de proteínas totales de ensayos fermentativos*

Cepa	Sustrato	Concentración de proteínas totales (mg/mL)			Promedio	Desviación Estándar	Coeficiente de Variación
		I	II	III			
FC-5	Maíz	0,014	0,012	0,009	0,012	0,003	0,2157
	Betarraga	0,008	0,006	0,002	0,005	0,003	0,5728
	Perejil	0,04	0,031	0,033	0,035	0,005	0,1360
FC-13	Maíz	0,007	0,006	0,009	0,007	0,002	0,2083
	Betarraga	0,005	0,004	0,002	0,004	0,002	0,4166
	Perejil	0,029	0,032	0,032	0,031	0,002	0,0560

En la Tabla 18 se detalla los valores medios de la concentración de proteínas totales obtenidas al evaluar los extractos crudos de los medios fermentativos de dos cepas de hongos (FC-5 y FC-13) en sustratos vegetales molidos: Mazorca de maíz, hojas de betarraga y hojas de perejil.

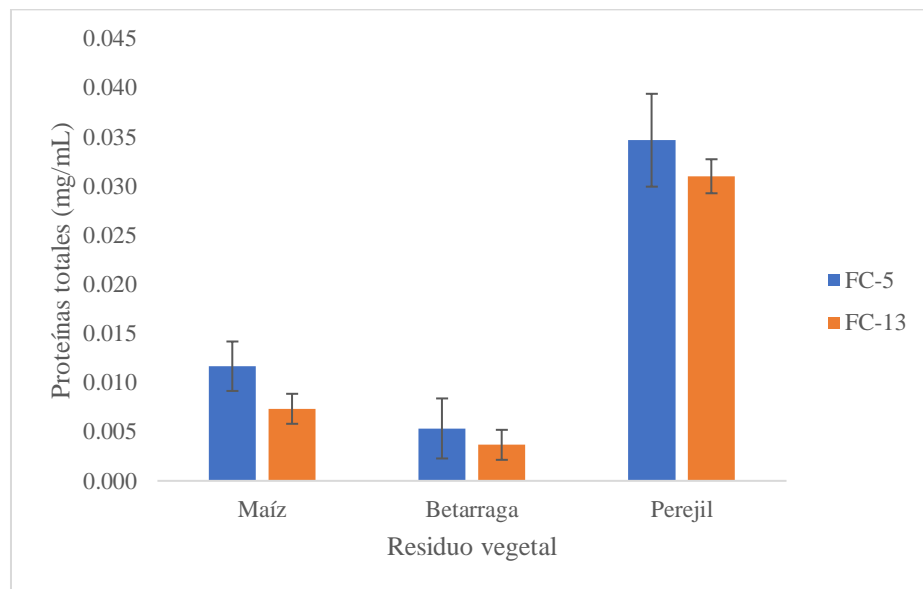
**Tabla 19**

*Cantidad de proteínas totales de ensayos fermentativos*

<b>Cepa</b>	<b>Sustrato</b>	<b>Concentración de proteínas totales (mg/mL)</b>	<b>Volumen total (mL)</b>	<b>Proteína total (mg)</b>
<b>FC-5</b>	<b>Maíz</b>	0,012	75	0,9
	<b>Betarraga</b>	0,005	75	0,375
	<b>Perejil</b>	0,035	75	2,625
<b>FC-13</b>	<b>Maíz</b>	0,005	80	0,4
	<b>Betarraga</b>	0,003	80	0,24
	<b>Perejil</b>	0,031	80	2,48

**Figura 18**

*Concentración de proteínas totales de ensayos fermentativos*



En la figura 18, el menor valor de concentración de proteínas totales fue de 0,003 para la cepa FC-13 cuando se empleó como residuo vegetal las hojas de betarraga.

También se observa que se obtuvieron mayores valores concentración de proteínas totales al emplear como sustrato el residuo vegetal de hojas de perejil, llegando a ser de 0,035 mg/mL y 0,031 mg/mL para las cepas FC-5 y FC-13 respectivamente. Lo que sugiere poder utilizar dicho sustrato como fuente de carbono para producir la enzima celulasa.

#### 4.4.2 Determinación de la actividad catalítica

Al emplear varios sustratos molidos (mazorca de maíz, hojas de betarraga y hojas de perejil) como fuente de carbono; y mediante la obtención del extracto crudo de dicha fermentación se obtuvieron los siguientes valores de actividad catalítica:

**Tabla 20**

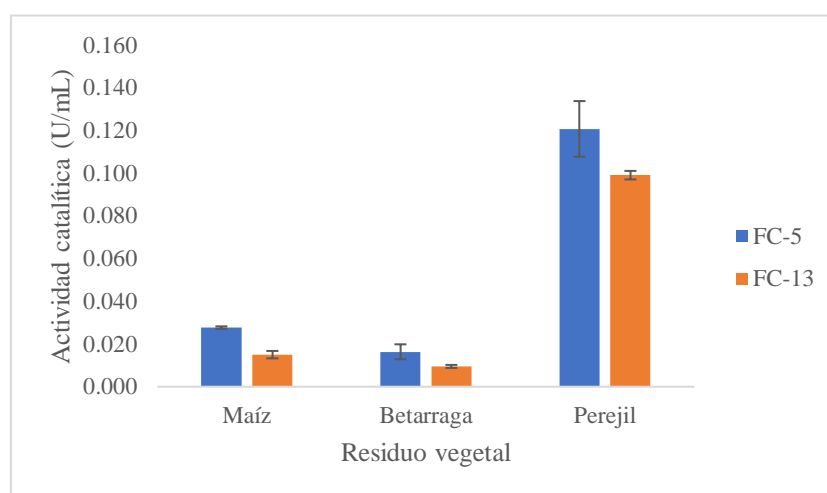
*Actividad enzimática celulasa en ensayos fermentativos*

Cepa	Sustrato	AE (U/mL)			Promedio	Desviación Estándar	Coeficiente de Variación
		I	II	III			
FC-5	Maíz	0,028	0,027	0,028	0,028	0,001	0,0208
	Betarraga	0,013	0,020	0,016	0,016	0,004	0,2150
	Perejil	0,120	0,134	0,108	0,121	0,013	0,1078
FC-13	Maíz	0,016	0,016	0,013	0,015	0,002	0,1154
	Betarraga	0,010	0,008	0,009	0,010	0,001	0,0744
	Perejil	0,101	0,097	0,099	0,099	0,002	0,0202

En la Tabla 20 se exhibe los valores medios de la actividad enzimática celulasa obtenidas al evaluar los extractos crudos de los medios fermentativos obtenidos de dos cepas de hongos (FC-5 y FC-13) en sustratos vegetales molidos: mazorca de maíz, hojas de betarraga y hojas de perejil. Donde se comparan en cuál de ellos se obtuvo mayores valores de actividad, siendo para ambas cepas de hongos cuando se utilizó como sustrato vegetal las hojas de perejil.

**Figura 19**

*Actividad catalítica de ensayos fermentativos utilizando distintos sustratos*



En la figura 19 se observa la que la mayor actividad celulasa registrada fue en el extracto crudo obtenido a partir de la fermentación del residuo vegetal hojas de perejil para ambas cepas (FC-5 y FC-13).

Cuando se usó como sustrato mazorca de maíz molido, los valores de actividad catalítica obtenidos fueron de 0,015 U/mL para la cepa FC-13 y casi el doble (0,028 U/mL) para la cepa FC-5. Los valores mas bajos de actividad catalítica se registraron empleando el sustrato hojas de betarraga siendo el menor registro medido en el extracto crudo de 0,010 U/mL.

En base a los resultados obtenidos se seleccionó la cepa FC-5 para la producción y caracterización de la enzima; por presentar el mayor valor de actividad catalítica producida utilizando como residuo vegetal hojas de perejil.

#### **4.4.3 Determinación de la actividad específica**

Los resultados de actividad específica se determinaron en base a los valores obtenidos al medir concentración de proteínas totales y la actividad catalítica teniendo la siguiente tabla resumen:

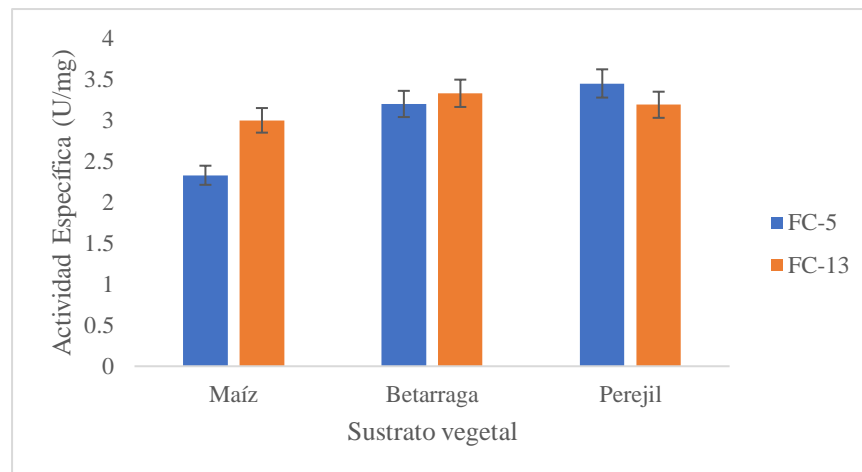
**Tabla 21***Actividad específica de ensayos fermentativos utilizando distintos sustratos*

<b>Cepa</b>	<b>Sustrato</b>	<b>Actividad Catalítica (U/mL)</b>	<b>Concentración de proteínas totales (mg/mL)</b>	<b>Actividad Específica (U/mg)</b>
<b>FC-5</b>	<b>Maíz</b>	0,028	0,012	2,33
	<b>Betarraga</b>	0,016	0,005	3,20
	<b>Perejil</b>	0,121	0,035	3,45
<b>FC-13</b>	<b>Maíz</b>	0,015	0,005	3,00
	<b>Betarraga</b>	0,010	0,003	3,33
	<b>Perejil</b>	0,099	0,031	3,19

En la Tabla 21 se exhibe los valores de la actividad específica obtenida, donde se determinó la concentración de proteínas totales del extracto crudo de los ensayos experimentales utilizando las cepas FC-5 y FC-13. Lo cual permitió comparar las unidades de enzima por cada mg de proteína total bajo la preferencia de un determinado sustrato.

**Figura 20**

*Actividad específica de ensayos fermentativos utilizando distintos sustratos*



En la figura 20, la actividad específica de 3,45 U/mg para FC-5 y 3,19 U/mg para FC-13 que corresponden al utilizar como residuo vegetal hojas de perejil son valores más altos obtenidos respecto a los otros sustratos. Al comparar los valores de actividad específica se observa que la betarraga fue el sustrato con el que se obtuvo valores bastantes cercanos y los menores valores de actividad específica se registraron al utilizar la mazorca de maíz molido como sustrato.

#### 4.4.4 Determinación del rendimiento

Se consideró el volumen total de extracto crudo producido a partir de los gramos de sustrato seco del vegetal empleado en la fermentación como se indica a continuación:

**Tabla 22**

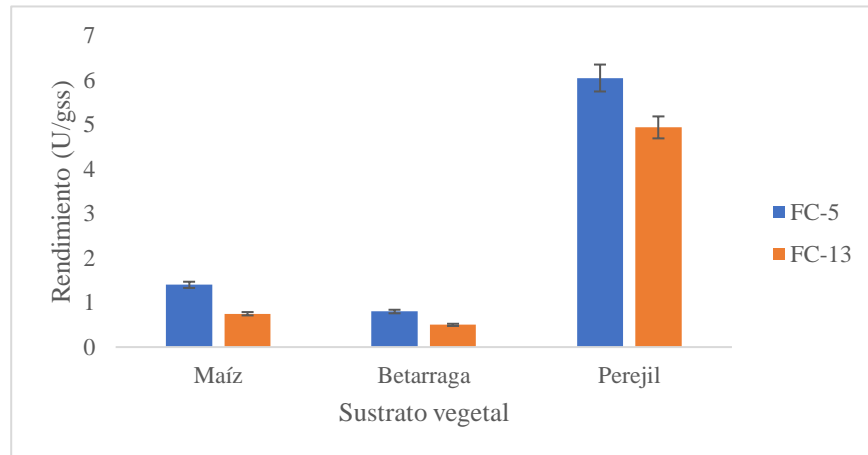
*Rendimiento de la producción por residuo vegetal utilizado*

<b>Cepa</b>	<b>Sustrato</b>	<b>Actividad Catalítica (U/mL)</b>	<b>Volumen total de extracto crudo (mL)</b>	<b>Unidades totales (U)</b>	<b>Sustrato (g)</b>	<b>Rendimiento (U/gss)</b>
<b>FC-5</b>	<b>Maíz</b>	0,028	75	2,10	1,5	1,40
	<b>Betarraga</b>	0,016	75	1,20	1,5	0,80
	<b>Perejil</b>	0,121	75	9,08	1,5	6,05
<b>FC-13</b>	<b>Maíz</b>	0,015	75	1,12	1,5	0,75
	<b>Betarraga</b>	0,01	75	0,75	1,5	0,50
	<b>Perejil</b>	0,099	75	7,42	1,5	4,94

En la Tabla 22 se exhibe los valores de la actividad catalítica, obtenida de las cepas FC-5 y FC-13, de acuerdo con la cantidad del sustrato utilizado para la obtención de las unidades enzimáticas totales y el rendimiento.

**Figura 21**

*Comparación del rendimiento de la producción de enzima celulasa*



En la figura 21 se observa que para ambas cepas FC-5 y FC-13 al utilizar como sustrato vegetal las hojas de perejil se obtuvieron los valores más altos respecto a otros sustratos vegetales empleados.

El menor valor se registró para la cepa FC-13 utilizando el sustrato hojas de betarraga siendo éste de 0,50 unidades enzimáticas por cada gramo de sustrato seco; mientras que para la cepa FC-5 se produjo el mayor valor de 6,05 unidades enzimáticas por cada gramo de sustrato seco (U/gss).

Lo cual quiere decir que al utilizar como residuo vegetal hojas de perejil se obtiene mayor cantidad de enzima que utilizando la mazorca de maíz molido; la betarraga no ofrece un rendimiento óptimo en ninguno de los casos para ambas cepas. Por lo que es más conveniente producir la enzima en hojas de perejil.

#### 4.5 Caracterización enzimática de celulasa de la cepa FC-5

Con fines de caracterización se realizó un fraccionamiento por sulfato de amonio para visualizar mayor actividad de la celulasa (Tabla 23) en los ensayos de efecto de pH, temperatura, y termoestabilidad.

##### 4.5.1 Fraccionamiento por sulfato de amonio

**Tabla 23**

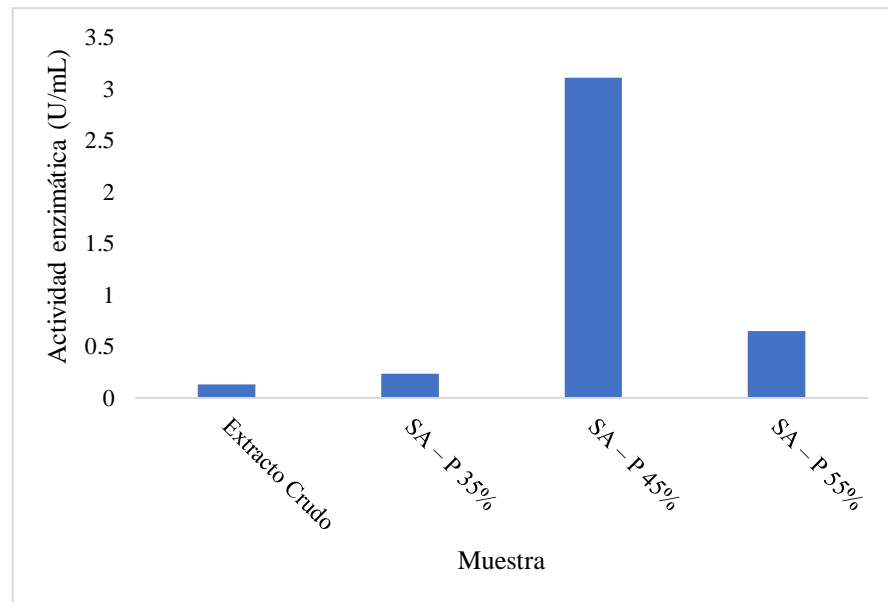
*Actividad enzimática celulasa en el fraccionamiento por sulfato de amonio*

Muestra	LN (540 nm)	AR ( $\mu\text{mol/mL}$ )	AE (U/mL)	V (mL)	AT (U)	R (%)
<b>Extracto Crudo</b>	0,4992	2,6997	0,133	30	3,99	100
SA – P 35%	0,4391	2,3747	0,234	1	0,234	5,86
SA – P 45%	0,3854	2,0842	3,108	1	3,108	77,89
SA – P 55%	0,2436	1,3174	0,648	1	1,324	16,25
SA – S 35%	0,4226	2,2854	0,112	29	3,248	81,40
SA – S 45%	0,006	0,0324	0,000	29	0,000	0
SA – S 55%	0,004	0,0216	0,000	29	0,000	0

SA – P: Precipitado en sulfato de amonio; SA – S: Sobrenadante en sulfato de amonio. LN: Lectura neta; AR: Azúcares reductores; AE: Actividad enzimática; V: Volumen; AT: Actividad total; R: Rendimiento

**Figura 22**

*Actividad enzimática del fraccionamiento por sulfato de amonio*



Cuando se empezó a precipitar el extracto crudo con sulfato de amonio a concentraciones desde 35%, 45% y 55% y luego de medir la actividad enzimática se observó que los valores obtenidos fueron superiores a 0,133 U/mL. Donde el máximo valor de actividad medida de la reacción fue de 3,108 U/mL a un porcentaje de saturación con sulfato de amonio del 45%; fue a este porcentaje donde se logró recuperar mayor cantidad de enzima celulasa.

La enzima concentrada por el fraccionamiento por sulfato de amonio obtuvo un rendimiento del 77,89% de la enzima, elevando la actividad enzimática en 2,975 U/mL

#### 4.5.2 Efecto del pH sobre la actividad celulasa

La enzima obtenida mediante el fraccionamiento por sulfato de amonio se utilizó para determinar el efecto del pH en la actividad enzimática; se realizaron los ensayos para los tampones acetato de sodio (pH 4 y pH 5), fosfato de sodio (pH 6 y pH 7), Tris HCl (pH 8), Glicina NaOH (pH 9, pH 10) los valores de actividad enzimática expresada en U/mL fueron los siguientes:

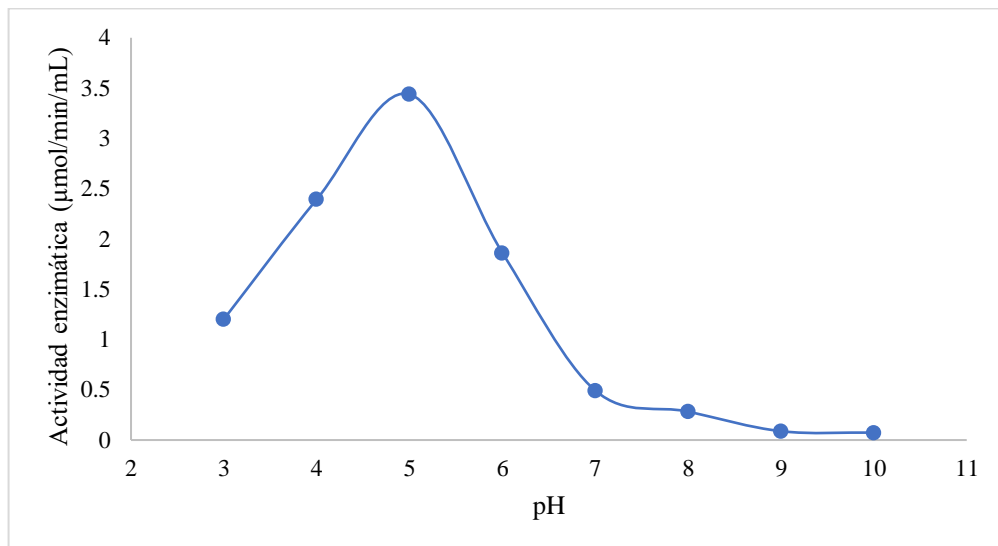
**Tabla 24**

*Actividad enzimática a distintos pH*

<b>pH</b>	<b>Actividad Enzimática (U/mL)</b>	<b>Desviación Estándar</b>	<b>Coefficiente de Variación</b>
pH 3	1,202	0,133	0,0680
pH 4	2,393	0,543	0,2270
pH 5	3,438	0,133	0,0390
pH 6	1,861	0,133	0,0720
pH 7	0,492	0,162	0,3290
pH 8	0,283	0,019	0,0670
pH 9	0,088	0,029	0,3260
pH 10	0,074	0,010	0,1290

**Figura 23**

*Curva de pH de actividad enzimática celulasa*



En la figura 23, se puede observar que aún existe actividad en los ensayos de pH 3 hasta pH 7, siendo el pH 5 óptimo donde la actividad celulasa fue de 3,438 U/mL. Cuando se modificó el pH para las reacciones enzimáticas se observó que desde el uso de tampón con pH superiores a 5 se va registrando disminución en los valores de actividad; se obtuvo como resultado que para pH 8 a pH 10 la actividad enzimática es inferior a 0,5 U/mL; a pH 10 no hubo actividad detectable la cual apenas alcanzó 0,074 U/mL.

### 4.5.3 Efecto de la temperatura sobre la actividad celulasa

Los valores de actividad celulasa para temperaturas de 40°C, 50°C, 60°C, 70°C y 80°C, utilizando el tampón acetato pH 5 100 mM y como sustrato papel filtro Whatman N°1, son los que se muestran a continuación:

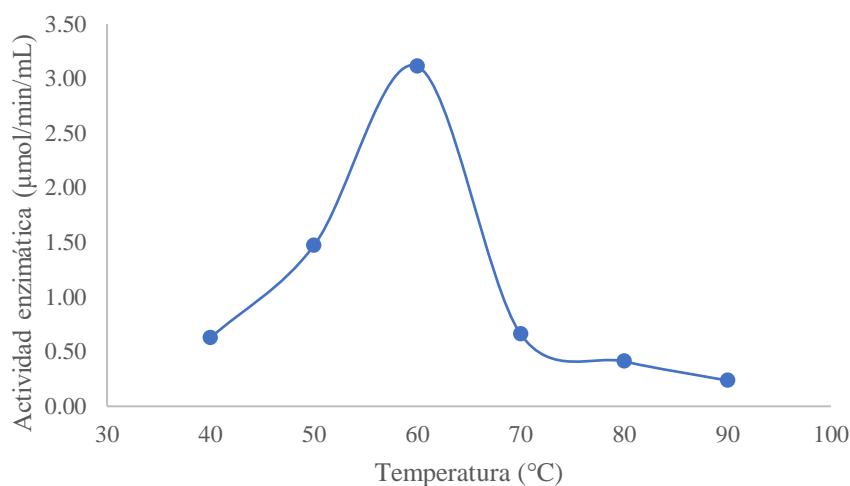
**Tabla 25**

*Actividad enzimática a distintas temperaturas*

<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Actividad Enzimática (U/mL)</b>	<b>Desviación Estándar</b>	<b>Coefficiente de Variación</b>
40	0,627	0,219	0,350
50	1,470	0,172	0,117
60	3,114	0,648	0,208
70	0,661	0,076	0,115
80	0,411	0,048	0,116
90	0,236	0,086	0,364

**Figura 24**

*Curva de temperatura de actividad enzimática celulasa*



En la figura 24, la enzima celulasa obtenida del hongo FC-5 obtuvo una máxima actividad enzimática a la temperatura de 60°C a pH5 siendo 3,114 U/mL.

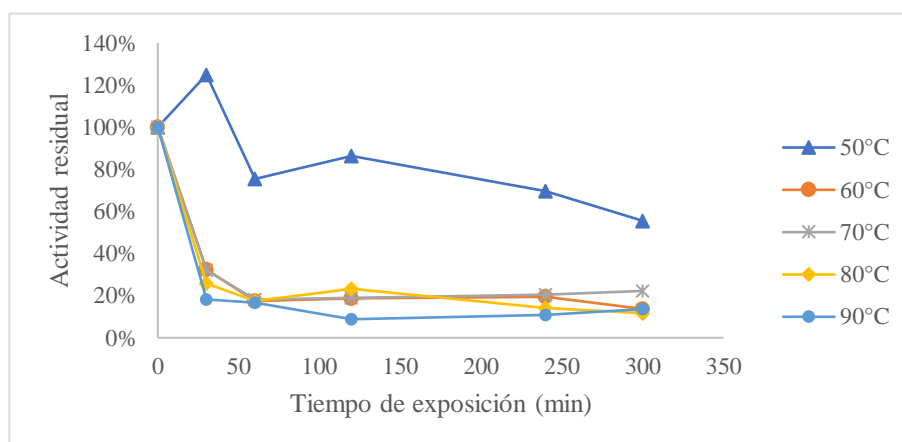
Cuando se modificaron las temperaturas de incubación para las reacciones enzimáticas se observó que desde la temperatura de 70°C se va registrando disminución en los valores de actividad. El menor valor de actividad enzimática de celulasa se registró a una temperatura de 90°C siendo ésta de 0,236 U/mL

#### **4.5.4 Termoestabilidad de la enzima celulasa**

Las soluciones enzimáticas que se recolectó a diferentes tiempos: t1 (30 minutos), t2 (60 minutos), t3 (120 minutos), t4 (240 minutos), t5 (300 minutos) como se muestra en la tabla 26.

**Tabla 26***Actividad enzimática a distintas temperaturas y tiempo de exposición*

Temperatura (°C)	Tiempo de exposición (minutos)					
	0	30	60	120	240	300
50	3,114	3,892	2,346	2,688	2,166	1,730
60	3,114	1,007	0,544	0,584	0,607	0,427
70	3,114	0,998	0,566	0,589	0,638	0,697
80	3,114	0,804	0,539	0,724	0,440	0,364
90	3,114	0,571	0,521	0,274	0,342	0,422

**Figura 25***Termoestabilidad de la celulasa*

Respecto a la estabilidad térmica, se observa que, respecto al control, la celulasa preserva su actividad arriba del 50 % durante 300 min luego de haber sido expuesta a la temperatura de 50 °C. Sin embargo, para tratamientos de exposición a temperaturas superiores a 50 °C solo presenta actividad residual alrededor del 20% durante 300 min.

## CAPÍTULO V

### DISCUSIÓN

Se aislaron un total de 8 hongos de las pilas composteras situadas a una profundidad de 40 cm, con temperaturas que oscilaron entre 45 °C y 60 °C. En lo reportado por Di Piazza et al., (2020), aislaron hongos en un rango de temperaturas de 45 °C a 50 °C y mediante herramientas moleculares específicas (ITS, beta-tubulina, calmodulina y factor de elongación 1-alfa) identificaron especies termófilas de los géneros *Thermoascus* y *Thermomyces*, que podrían ser claves durante el compostaje. Además, se encontró la presencia de varias especies de hongos potencialmente dañinos, como *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus terreus*. Estas similitudes en las especies aisladas (géneros *Aspergillus* y *Thermomyces*) podrían atribuirse a factores como las altas temperaturas en las pilas composteras, la capacidad celulolítica de estos microorganismos, sus bajos requerimientos nutricionales y su habilidad para adaptarse a diferentes ambientes (Alcarraz et al., 2010).

La predominancia de especies del género *Aspergillus* entre los aislados de los hongos ha sido confirmada por otros estudios previos sobre el tema. Hefnawi et al., (2019) y Rakilla et al., (2024). En el presente estudio, cuatro cepas presentaron características morfológicas similares a las reportadas para el género *Aspergillus*.

*Aspergillus fumigatus* se destaca entre las especies fúngicas de la fase termófila del compostaje según Hefnawi et al., (2019), y su presencia se debe a que degradan materia en descomposición, pueden sobrevivir en rangos de temperatura amplios (entre 12 °C y 65 °C) y en condiciones de pH variadas (entre 2,1 y 8,8). Una investigación reciente realizada por Do Nascimento et al., (2023) destacó que *Aspergillus fumigatus* muestra una mayor producción de enzimas lignocelulolíticas cuando se cultiva en diferentes fuentes de carbono, como glucosa, avicel y paja de arroz. Específicamente, se observó un incremento significativo en la actividad enzimática en el medio con paja de arroz, indicando una capacidad adaptativa del hongo para modular la síntesis de enzimas en respuesta a las condiciones ambientales específicas. En resumen, el aislamiento de hongos termófilos, principalmente de los géneros *Aspergillus* y *Thermomyces*, en pilas de compostaje con temperaturas entre 45 °C y 60 °C, destaca la importancia de estos microorganismos en el proceso de descomposición de la materia orgánica.

De los ocho hongos aislados solo cinco produjeron actividad celulolítica en CMC estos resultados son similares a los reportados por Nguyen et al., (2021) quienes lograron aislar hongos filamentosos celulolíticos envueltos en la degradación del jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*) para producir fertilizantes orgánicos, destacando a *Aspergillus oryzae*, quién mostró la mayor actividad celulasa con un diámetro de hidrólisis promedio de 35 milímetros; en el presente trabajo el hongo celulolítico FC-5 del género *Aspergillus* sp. evidenció un halo de

hidrólisis promedio de 67 milímetros. Por lo que dicha especie podría tener potencial para ser usado como inóculo en futuros trabajos de compostaje.

Tomando en cuenta los valores de índice enzimático obtenidos, se seleccionaron cinco hongos celulolíticos que mostraron un diámetro de actividad celulolítica superior a 4 cm. De estos, cuatro fueron aislados de la pila de compostaje con una temperatura de 50 °C, mientras que la cepa FC-13 (*Thermomyces* sp.) fue encontrado en la pila de compostaje a 60 °C. Estos resultados coinciden con los hallazgos de Keng y colaboradores (2023), quienes identificaron a *Thermomyces dupontii* como una especie que crece a temperaturas entre 50 °C y 60 °C.

Las zonas de visualización de halos del presente trabajo fueron inferiores a los halos de 9 cm en promedio que produjeron *Trichoderma resei* en un medio revelador de pH 5 (Kogo et al., 2017), probablemente el pH del medio revelador no fue óptimo ya que se trabajó a pH 7. Sin embargo, pese a esta condición de pH, los valores de diámetro de halos obtenidos entre 4,7 cm a 6,7 cm y en base al análisis estadístico del índice enzimático permiten claramente identificarlos como hongos celulolíticos.

Estos hongos fueron evaluados respecto a su capacidad de crecimiento en diferentes niveles de pH y temperatura (Tablas 11 y 14), ya que estos dos factores son críticos durante las distintas fases del proceso de compostaje de residuos orgánicos. La adaptación de estos hongos es crucial debido a los procesos

específicos que ocurren en las pilas de compostaje. Durante este proceso, las temperaturas elevadas y la variación en el pH son condiciones comunes que resultan de la actividad microbiana intensa. Los hongos celulolíticos, desempeñan un papel fundamental al secretar enzimas capaces de descomponer los componentes celulósicos y lignocelulósicos de los residuos orgánicos. Adaptarse a estas condiciones extremas les permite prosperar y contribuir eficientemente al proceso de compostaje, facilitando la transformación de residuos orgánicos en compuestos más estables y nutrientes disponibles para el suelo (Zhang, 2013).

Los hongos aislados con mejor actividad celulasa probablemente se deban a las condiciones del suelo con alto contenido en materia orgánica (residuos vegetales municipales, cáscaras, sales, etc.) favoreciendo así la actividad enzimática de los hongos filamentosos que quienes por naturaleza son descomponedores primarios de la materia orgánica y por lo tanto colonizan e hidrolizan muy rápido dichos compuestos. (Aruani et al., 2012)

En ambos factores abióticos la cepa fúngica FC-5 tubo la mejor respuesta en las diferentes condiciones estudiadas. Sánchez, T. (2009), estudió a *Aspergillus fumigatus* a partir de tejidos vegetales en descomposición, destacando su naturaleza de capacidad competitiva con otros microorganismos y observando igualmente ser sobresaliente en cuanto a crecimiento en la fase termófila.

La producción de biomasa de los hongos celulolíticos aislados fue mayor en medio ácido, siendo el pH 5 en donde se obtuvo los promedios más altos (biomasa

promedio de 18,02 mg/mL); así como crecen mejor a 50 °C (biomasa promedio 22,19 mg/mL), dichas condiciones también se encontraron en Guzmán et al., (2014) quien menciona que en las pilas de compostaje, la respuesta a estos parámetros ambientales se va relacionando con la producción de ácidos orgánicos por la acción de los hongos y la consecuente disminución del pH del medio y el incremento de la temperatura favoreciendo su crecimiento.

Los resultados obtenidos son similares a lo descrito por Mehboob et al., (2014) que demostraron un pH óptimo de 5,5 y una temperatura de 55 °C sobre la actividad celulolítica para el hongo *Aspergillus fumigatus*. Se determinó que el rango óptimo de pH es de 5 y temperatura de 50°C. Así mismo, Song et al., (2024) en su trabajo reportó que la cepa *Aspergillus fumigatus* fue capaz de crecer a condiciones de pH 8,5 a 9,5 a 37 °C. Es por ello, que la selección de hongos celulolíticos con alta actividad enzimática a dichas condiciones abre la puerta a futuras investigaciones sobre su potencial aplicación en la mejora del proceso de compostaje.

Las características morfológicas observadas para la cepa FC-5 en medios de cultivo han desempeñado un papel fundamental en los acercamientos de identificación al género *Aspergillus*. Según estudios previos de Wabusya y Vicent (2015), las diferencias en la morfología de las colonias y las estructuras reproductivas en medios como MEA, YES y CYA han sido utilizadas para distinguir *Aspergillus fumigatus* de otras especies del mismo género. La especie *Aspergillus*

*fumigatus* generalmente forma colonias con características específicas como pigmentación y textura que pueden diferir de otras especies (Samson et al., 2000; Pitt y Hocking, 2009). El diámetro promedio de las colonias (45-55 mm), la alta tasa de crecimiento, las coloraciones grises verdosas en los medios (MEA, YES, CYA), la carencia de exudados y pigmentos solubles fueron características para el género *Aspergillus*. Además, la morfología de las fiálides y los conidios, particularmente la forma y tamaño de estos últimos, proporciona criterios adicionales para la identificación precisa de *Aspergillus fumigatus* (Raper y Fennell, 1965). Estas observaciones resaltan la importancia de integrar tanto la macro como la microscopía en la identificación de especies dentro del género *Aspergillus*.

En la literatura al comparar el crecimiento de *A. fumigatus*, *A. oerlinghausenensis* y *A. fischeri* se menciona que presentan tasas de crecimiento y patrones de esporulación similares en los medios de cultivo utilizados (MEA, CYA, YES), alcanzando un diámetro mayor de 50 mm en 7 días a 25 °C y produciendo conidios de color verde. Además, estas tres cepas presentan características morfológicas que las ubican con confianza en la sección Fumigati, como la formación de cabezas conidiales columnares, uniseriadas y con vesículas subglobosas (Houbraken et al., 2016). Según lo informado por Houbraken et al., (2016), *A. oerlinghausenensis* comparte la capacidad de crecer a 50 °C con *A. fumigatus* y *A. fischeri*.

Sin embargo, *A. oerlinghausenensis* se diferencia de *A. fumigatus* por una esporulación débil en MEA a 25 °C, una textura de colonia flocosa en CYA y MEA, y la presencia de vesículas subglobosas en lugar de subclavadas. Por otro lado, *A. fischeri* crece más lentamente a 50 °C (5–25 mm en CYA, 7 días) y produce fácilmente un estado sexual en agar extracto de malta, a diferencia de *A. oerlinghausenensis*, en la que no se observa ningún estado sexual en los cultivos. En nuestro caso la cepa FC-5 presentó un crecimiento en MEA de 55-60 mm a los 7 días con colonias de color gris y rugosas, descartando así que la cepa FC-5 se trate de un *A. fischeri* o *A. oerlinghausenensis*.

Los resultados obtenidos de la caracterización microscópica coinciden con las descripciones clásicas de *Aspergillus fumigatus*. Las hifas observadas fueron hialinas, tabicadas con un diámetro de 4 µm, características que son consistentes con las especificaciones para el género *Aspergillus* (de Hoog et al., 2020). Además, los conidióforos cortos de 300 µm y la ausencia de métulas son rasgos distintivos que también se han documentado previamente en la literatura (Raper y Fennell, 1965). Éste dato fue útil para distinguirlo de otras especies que podrían tener conidióforos más largos como *Aspergillus fischeri*. Las fiálides, con una morfología de botella alargada de 9 x 3,5 µm, se alinean con las descripciones típicas de *A. fumigatus* (Pitt y Hocking, 2009). Las conidias observadas fueron globulares, de pared lisa, hialinas y de dimensiones aproximadas de 3 x 2,5 µm, características que también son consistentes con las descripciones anteriores (Samson et al., 2000).

Adicionalmente, se utilizó clave taxonómica del género *Aspergillus*, según Wabusya y Vicent (2015) para identificar la cepa FC-05: Para las conidias de *Aspergillus fumigatus*, suelen ser globosas, hialinas y de pared lisa, medidas aproximadamente 2,5-3,5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las fialides en *Aspergillus fumigatus* son en forma de botella, con un cuello largo y delgado y una cabeza más ancha, típicamente miden alrededor de 8-12  $\mu\text{m}$  de largo. Y la morfología de los conidióforos, son cortos, generalmente no ramificados o muy poco ramificados. De acuerdo con lo descrito por Wabusya y Vicent (2015), la descripción morfológica de la cepa FC-5 está en concordancia con las características para el género *Aspergillus fumigatus*. Tales datos como la forma de las fialides, la ausencia de métulas y el tamaño y forma de los conidios.

Respecto a la caracterización molecular realizado para la cepa FC-5, se obtuvo por análisis de BLAST una similitud del 99,81% correspondiente para *Aspergillus fumigatus*, 98,87 % para *Aspergillus oerlinghausenensis* y 98,48 % para *Aspergillus fischeri*, indicando un índice de similitud alta entre las tres especies mencionadas. El análisis filogenético indicó que la cepa FC-5 se agrupó junto a *Aspergillus fumigatus* formando una rama sólida, mientras que *Aspergillus oerlinghausenensis* y *Aspergillus fischeri* aparecen en otra rama separada. Adicionalmente, este análisis indica que tanto *Aspergillus oerlinghausenensis* y *Aspergillus fischeri* son filogenéticamente cercanos a *Aspergillus fumigatus*. El análisis filogenético nos permite sugerir que la cepa FC-5 corresponde a *Aspergillus*

*fumigatus*, sin embargo, para una identificación determinante es necesario realizar más análisis utilizando otros marcadores moleculares como  $\beta$ -tubulina y calmodulina.

En resumen, se resalta el dominio del género *Aspergillus* sp. entre los aislados de la fase termófila del proceso de compostaje. En otros estudios sobre el mismo tema, para evaluar la diversidad de hongos en el compostaje orgánico de los residuos de fruta, se identificó a la especie *Aspergillus fumigatus* como la más frecuente (Wang et al., 2022), un resultado similar al observado en este estudio donde se destacó la cepa FC-5. También se ha reportado en Bilal et al., (2018) que los aislamientos de *Aspergillus fumigatus* tienen la habilidad de generar giberelinas y otras sustancias reguladoras de hormonas vegetales, además de producir ciertas sustancias que contribuyen a la descomposición, lo que amplía su versatilidad y su potencial en diversos procesos biológicos.

Respecto a la caracterización molecular realizado para la cepa FC-13, se obtuvo por análisis de BLAST una similitud del 99,84% correspondiente para *Thermomyces dupontii*, 95,74% para *Thermomyces lanuginosus* y 93,68% para *Thermomyces verrucosus*, indicando un índice de similitud distante entre las tres especies mencionadas. El análisis filogenético indicó que la cepa FC-13 se agrupó junto a *Thermomyces dupontii* formando una rama sólida, mientras que *Thermomyces lanuginosus* y *Thermomyces verrucosus* aparecen en otra rama separada. Adicionalmente, este análisis indica que *Thermomyces lanuginosus* y

*Thermomyces dupontii* son filogenéticamente cercanos. El análisis filogenético nos permite sugerir que la cepa FC-13 corresponde a *Thermomyces dupontii*, Sin embargo, para una confirmación más robusta, se recomienda la utilización de marcadores moleculares adicionales en futuros estudios de identificación molecular.

La identificación morfológica de la cepa FC-13 se basó en el estudio de características como el crecimiento a diferentes temperaturas, dado que el género *Thermomyces* incluye especies termófilas. Se observó que la cepa FC-13 creció bien a temperaturas entre 40-60 °C (figura 11), similar a lo reportado por Yousofvand et al., (2020) para *Thermomyces dupontii*, cuya temperatura óptima de crecimiento fue de 45 °C, y para *Thermomyces lanuginosus*, se menciona que crece óptimamente entre 45-50 °C, ambas especies reconocidas como termófilos verdaderos. En contraste, para *Thermomyces verrucosus* se menciona que tiene un crecimiento óptimo a temperaturas mesófilas de 25-30 °C (Morgenstern et al., 2012), temperaturas que no favorecieron el crecimiento de la cepa FC-13 ya que en estas condiciones se obtuvo un diámetro promedio de la colonia de 20 mm; indicando una afinidad más cercana de la cepa FC-13 a las especies termófilas.

En el presente estudio, las diferencias en las características morfológicas de las colonias y estructuras reproductivas en medios como MEA, YES y CYA fueron cruciales para caracterizar el crecimiento de la cepa FC-13. Las colonias del género *Thermomyces* típicamente alcanzan un diámetro superior a 50 mm en 7 días a 45

°C. En particular, *Thermomyces lanuginosus* se distingue por su textura flocosa en medio CYA (Yousofvand et al., 2020), mientras que *Thermomyces dupontii* presenta una colonia de color marrón grisáceo con borde blanco algodonoso y textura aterciopelada, similar a lo observado en la cepa FC-13. En MEA, la cepa FC-13 mostró colonias blancas y aterciopeladas con micelios incoloros y bordes irregulares beige, también sin exudados ni pigmentos solubles. En PDA las colonias fueron de color grisáceo sin exudados ni pigmentos solubles y reverso marrón oscuro.

En la cepa FC-13, se observaron conidióforos largos de 350  $\mu\text{m}$  emergiendo perpendicularmente de las hifas. Los conidios eran pequeños, de 2 x 2,2  $\mu\text{m}$ , con una pigmentación oscura bastante similar a la descrita por Yousofvand et al. (2020) para *Thermomyces dupontii*. En su estudio, mencionaron la presencia de hifas finas y coloreadas, con conidióforos largos y conidios unicelulares pequeños de 2 x 2,5  $\mu\text{m}$ , los cuales presentaban un color marrón oscuro y una pared lisa. Estos datos sugieren que la cepa FC-13 comparte características morfológicas significativas con *Thermomyces dupontii*.

En Keng y colaboradores (2023) mencionan a la especie *Thermomyces dupontii*, como un hongo termófilo y además determinaron a esta especie como un hongo productor de celulasas termoestables.

El hongo celulolítico FC-5 aislado de la pila compostera de 50 °C de la municipalidad provincial de Tacna tiene la mayor actividad celulolítica, seguida del hongo FC-13 de la pila de compostera del distrito de Ciudad Nueva. En una primera etapa la actividad celulolítica de estos 2 hongos resultó muy similar entre sí según los ensayos cualitativos (índice enzimático), mientras que en los ensayos cuantitativos (extracto crudo) fue de 0,121 U/mL para *Aspergillus* sp. y 0,099 U/mL para *Thermomyces* sp. al utilizar de sustrato vegetal hojas de perejil. Cuando se trabajó con la celulasa concentrada de *Aspergillus* sp se obtuvo 3,438 U/mL. En Vásquez et al., (2019) el valor de actividad fue de 0,692 U/mL tras 24 horas de fermentación sumergida utilizando como sustrato paja de trigo; mientras que en el trabajo elaborado por Sethi et al., (2016) con *Aspergillus niger*, se obtuvo como mayor valor 295,86 U/mL utilizando como sustrato cáscara de banana.

En un estudio realizado por Mrudula y Murugammal (2011), se menciona que el aserrín, las mazorcas de maíz y el bagazo son los sustratos más efectivos para producir celulasa, por el contrario, en nuestro caso no fue así ya que se obtuvo una actividad específica de 2,33 U/mg cuando se utilizó de sustrato mazorca de maíz molido.

Además, otros estudios como Ojumu et al., (2003) indican que se ha utilizado una amplia gama de materiales como bagazo de caña de azúcar, residuos de la producción de té, fibra de coco, salvado de trigo, salvado de arroz, entre otros. En el presente estudio se lograron obtener valores de actividad enzimática de los

extractos crudos de 0,016 U/mL cuando se utilizó hojas molidas de betarraga, 0,028 U/mL cuando se utilizó mazorca de maíz molido y 0,121 U/mL cuando se utilizó hojas molidas de perejil. Destacando así la capacidad de *Aspergillus* sp. para descomponer la biomasa de lignocelulosa y su secreción de proteínas extracelulares y el interés exploratorio de sus enzimas celulolíticas secretadas en presencia de diferentes fuentes de carbono.

Cuando se cultivó *Aspergillus fumigatus* en diferentes fuentes de carbono, como alfalfa, mazorca de maíz, aserrín, paja de trigo, paja de arroz y salvado de trigo, se descubrió que la mazorca de maíz y el aserrín eran los sustratos menos efectivos para la secreción de celulasa (Sherief et al., 2010). Durante la fermentación, varios factores pueden influir en la secreción extracelular de celulasa, aumentando o disminuyendo la actividad enzimática. El agotamiento de nutrientes en el medio a medida que progresa la fermentación puede limitar la capacidad del organismo. Además, los metabolitos tóxicos liberados por el organismo pueden alterar el pH del medio, lo que a su vez afecta la producción de celulasa. La glucosa, producto final de la acción de la celulasa, inhibe la síntesis de celulasa (Zhang y Lynd, 2005).

La producción de celulasa fúngica de la cepa de FC-5 presentó el valor máximo de actividad específica de 3,45 U/mg, mientras que en Okoye et al., (2013) la actividad específica para la celulasa precipitada con sulfato de amonio al 50% y dializada durante 12 horas fue de 3,154 U/mg, sugiriendo posiblemente emplear

sustrato pulpa de mazorca de maíz y utilizar estos métodos de concentración de enzima para generar valores más altos de actividad. Se obtuvo un rendimiento de la producción por cada gramo seco de residuo vegetal utilizado de 6,05 U/ggs (hojas de perejil), que fue un menor valor en comparación a lo obtenido en Grigorevski et al., (2009) donde se alcanzó 47 U/ggs (salvado de trigo y bagazo de caña) en tan solo 3 días donde las condiciones de fermentación en estado sólido favorecieron la producción, mientras que en nuestro caso fueron ensayos en fermentación sumergida empleando un sustrato diferente.

En Okoye et al., (2013) se registró actividad máxima de celulasa al cuarto día 3,82 U/mL utilizando mazorca de maíz molido (secado al sol) como única fuente de carbono; por el contrario, en nuestro caso al evaluar al séptimo día solo se logró registrar una actividad de 0,028 U/mL. Esto sugeriría que probablemente el sustrato empleado es rico en lignina, ya que la dureza de los materiales vegetales está asociada con la lignificación y/o edad del material vegetal. La lignina protege la celulasa y la hace inaccesible a la acción hidrolítica de las enzimas. Explicando de esta manera porque el emplear como sustrato vegetal las hojas de perejil molido se obtuvieron mayores valores de actividad; sugiriendo necesario un pretratamiento de los residuos vegetales previo a la ejecución de los experimentos de fermentación.

En la mayoría de los casos, las propiedades enzimáticas funcionales se revelan de forma clara con enzimas purificadas y, de la misma manera, factores imperantes como el pH y temperatura logran mostrarnos su actividad catalítica

óptima en determinados rangos (Jahangeer, et al., 2005). En el presente estudio, se descubrió que la actividad de celulasas totales de *Aspergillus* sp. tiene una actividad óptima de 3,438  $\mu\text{mol}/\text{mL}/\text{min}$  a pH 5. Sin embargo, Gilna y Khaleel (2011) encontraron que una cepa de *Aspergillus fumigatus* tenía un pH óptimo de 6,5. Donde el aumento de la concentración de iones de hidrógeno presente en la solución demostró una tendencia negativa evidente. De manera similar, los resultados obtenidos por Nisar y colaboradores (2022) mencionan que la actividad celulasa producida por *Thermomyces dupontii* fue óptima y bastante estable a pH 5,5 y, aumentos graduales produjeron una decaída en la actividad de la enzima.

Otro estudio realizado por Sulyman y colaboradores (2020), demostraron un resultado distinto, donde la actividad celulasa óptima fue a pH 4 y, valores aumentados en 1 unidad, resultó en la pérdida en más del 50 % de su actividad. Esto puede explicarse debido a los métodos de concentración y purificación empleados, mientras que en nuestro caso empleamos únicamente un método de concentración (Método de fraccionamiento por sulfato de amonio), Sulyman y colaboradores, evaluaron el efecto de un extracto crudo sin purificar y un extracto concentrado por sulfato de amonio y diálisis y adicionalmente, purificado por filtración en gel, lo que explica y se relaciona con las propiedades denotadas en la celulasa producida. Así mismo, se sugiere que una enzima celulasa purificada producida por hongos es moderadamente activa en una solución ácida, mientras que en zonas cercanas a la neutralidad y alcalinidad existe una fuerte disminución de la actividad celulasa,

pudiéndose deber a la destrucción del sitio activo, así como cambios en la estructura secundaria o terciaria de la celulasa (Sulyman et al., 2020).

Los ensayos realizados para la búsqueda de la temperatura óptima de la celulasa producida se realizaron en un rango de 40 – 90 °C, mostrándonos una actividad óptima a 60 °C con una actividad enzimática de 3,114  $\mu\text{mol/mL/min}$ . Valores inferiores a la óptima muestra un descenso constante de la actividad, mientras que valores superiores demuestra una reducción drástica de la actividad celulolítica. Saroj et al., (2018) realizaron ensayos similares en un rango de temperaturas entre 30 y 80°C, donde su intento para determinar la temperatura óptima de una CMCasa cruda fue de 60 °C, esta enzima fue producida por un hongo termófilo identificado como *Aspergillus fumigatus* JCM 10253, demostrando así que esta temperatura es favorable para la actividad y estabilidad de la celulasa. Por el contrario, en un estudio realizado por El-Baroty et al. (2019), utilizando a *Aspergillus terreus* para la producción de celulasas extracelulares, logró descubrir que la temperatura óptima para dicha celulasa (CMCasa) está en el rango entre 35 – 40 °C y una actividad de  $3,19 \pm 0,093 \text{ U/mL}$ . Este resultado se explica por las condiciones de crecimiento del hongo productor y del lugar aislado, mostrando así unas condiciones mesófilas de crecimiento óptimo a 37 °C, reforzando de esta manera la hipótesis que las características funcionales de una enzima o proteína expresada y secretada están relacionadas a las condiciones del microorganismo productor.

Por otro lado, Immanuek et al., (2007) descubrieron que la celulasa de otra cepa de *Aspergillus fumigatus* tenía una temperatura óptima de 40°C; mientras que Gilna y Khaleel (2011) informaron que otra cepa de la misma especie tenía una temperatura óptima de 32 °C. Estas discrepancias podrían atribuirse a las diferencias en las cepas y especies de organismos utilizados en la producción de las enzimas.

Respecto a la estabilidad térmica de la enzima celulasa obtenida de *Aspergillus* sp. preserva su actividad arriba del 50 % hasta 300 minutos a una temperatura de 50 °C, también se observó que su actividad se mantuvo alrededor del 20 % de su valor máximo después de una incubación a temperaturas de 70 °C y 80 °C durante 120 minutos.

La enzima fue bastante estable cuando se almacenó a 50 °C durante 45 minutos aproximadamente similar a lo encontrado en Okoye et al., (2013) donde fue estable en temperaturas de 45 °C durante una hora la celulasa obtenida de una cepa de *Aspergillus fumigatus*. En el presente estudio la estabilidad de la enzima celulasa cayo entre 60 °C y 90 °C, pero no disminuyo entre 60 °C y 70 °C, más allá de 80 °C la estabilidad de la enzima continúo disminuyendo (figura 25). El porcentaje de pérdida de la actividad de la enzima entre 60 °C y 80 °C durante 60 minutos fue de aproximadamente al 70 %. Mientras que a 70 °C se observó una pérdida de actividad durante las primeras 5 horas de hasta el 80 %. La pérdida de actividad de hasta el 65 % fue de manera rápida a partir de 60 °C durante los 30

primeros minutos. Concluyendo que la enzima obtenida tiene cualidades para ser útil en aplicaciones industriales dada su estabilidad a estas temperaturas.

A medida que la temperatura sube a 60 °C, se observa que la actividad de la enzima disminuye constantemente. Esta disminución confirma que las temperaturas de almacenamiento afectan la duración y la actividad de las enzimas. Investigaciones anteriores sobre termoestabilidad de Okoye et al., (2013) han mostrado que las enzimas se conservan mejor a temperaturas muy bajas para mantener su actividad. Incluso enzimas solubles almacenadas a 40 °C pierden parte de su actividad con el tiempo debido a que no están en su entorno natural. Por lo tanto, la inmovilización y la liofilización son opciones preferidas para enzimas costosas que pierden actividad, aunque se almacenen a bajas temperaturas. Sin embargo, como se explica en Gilna y Khaleel, (2011) la estabilidad de las enzimas que produce un organismo está fuertemente influenciada por la temperatura de su hábitat natural. Por ejemplo, los organismos termófilos que viven en aguas termales suelen secretar enzimas termoestables. La temperatura del hábitat natural del organismo utilizado para producir celulasa determina la estabilidad térmica de la celulasa producida.

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSIONES

- Se aisló un total de ocho especies de hongos del compost durante la fase termófila, con temperaturas comprendidas entre 50°C y 65°C. De estas especies, solo cinco mostraron actividad celulolítica. Entre estas cepas, se seleccionaron dos para la caracterización molecular; se identificó a la cepa FC-5 como *Aspergillus* sp., y FC-13, como *Thermomyces* sp.
- Los hongos celulolíticos identificados *Thermomyces* sp y *Aspergillus* sp. tuvieron una capacidad celulolítica de 1,422 y de 1,476 respectivamente significativamente diferente al resto de hongos. El hongo *Aspergillus* sp. tuvo la mejor actividad celulolítica y capacidad de crecimiento a diferentes niveles de pH y temperatura.
- La mayor cantidad de celulasa fúngica obtenida de la cepa FC-5 fue cuando se utilizó sustrato hojas de perejil molido en el medio fermentativo; la actividad catalítica fue 0,121 U/mL, la actividad específica de 3,45 U/mg y el rendimiento de la producción por cada gramo seco de residuo vegetal utilizado de 6,05 U/ggs
- La enzima celulasa de la cepa FC-5 concentrada por fraccionamiento con sulfato de amonio fue estable a 50°C durante una hora, disminuyendo esta actividad hasta el 50% de su actividad máxima cuando estuvo cinco horas a 50°C. La actividad máxima fue a pH 5 y la temperatura óptima de reacción de 60°C.

## **CAPÍTULO VII**

### **RECOMENDACIONES**

- Se recomienda al laboratorio de investigación complementar la identificación de las especies mediante el uso de marcadores moleculares adicionales como beta-tubulina, calmodulina y factor de elongación 1-alfa. Estos marcadores ofrecen una mayor precisión y robustez en la caracterización genética de los hongos, permitiendo una clasificación más precisa y confiable que únicamente el análisis cualitativo basado en características macroscópicas y microscópicas.
- Para futuras investigaciones con las cepas se recomienda a los tesisistas emplear pretratamientos antes de utilizar los sustratos vegetales en los ensayos de fermentación, con el fin de eliminar la lignina presente, para que sea accesible la acción hidrolítica de la enzima celulasa.
- Se recomienda realizar un diseño experimental de optimización del medio de fermentación, donde posiblemente al utilizar un medio de cultivo más concentrado o conformado por cantidades diferentes al empleado se logre encontrar las condiciones más favorables de producción de la enzima.
- Se sugiere realizar la purificación de la enzima celulasa a fin de aislar solo la proteína de interés y caracterizarla, obteniendo valores más exactos de la actividad enzimática. Para ello se sugiere incluir las siguientes técnicas: SDS-Page, Zimograma y la realización de cinética enzimática.

## CAPÍTULO VIII

### BIBLIOGRAFÍA

- Abdullah, R., Tahseen, M., Nisar, K., Kaleem, A., Iqtedar, M., Saleem, F. y Aftab, M. (2021). Statistical optimization of cellulases by *Talaromyces thermophilus* utilizing *Saccharum spontaneum* a novel substrate. *Electronic Journal of Biotechnology*. 51, 79 – 87. DOI: 10.1016/j.ejbt.2021.03.007
- Alcarraz, M., Flores, A. y Godoy J. (2010). Producción de celulasas por inmovilización celular para el tratamiento de efluentes industriales lignocelulósicos. *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica*. 13, 97-102.  
DOI: <https://doi.org/10.15381/iigeo.v13i26.507>
- Álvarez, P., Corzi, Z., Yañez, G. y Pérez, Y. (2014). Actividades Enzimáticas de Hongos para el Pretratamiento de Residuos Lignocelulósicos. *Biotecnología*, 18(3), 11 – 29.  
URL: [https://smbb.mx/wp-content/uploads/2017/10/Revista\\_2014\\_V18\\_N3.pdf](https://smbb.mx/wp-content/uploads/2017/10/Revista_2014_V18_N3.pdf)
- Andrade, J., Rocha, A., Santos, P. y Pires, R. (2011). Production and Partial Characterization of Cellulases from *Trichoderma* sp. IS-05 Isolated from Sandy Coastal Plains of Northeast Brazil. *Enzyme research*. 2011, 1 – 7. DOI: 10.4061/2011/167248

- Anastasi, A., Varese, G. y Marchisio, V. (2005). Isolation and identification of fungal communities in compost and vermicompost. *Mycologia*. 97(1). 33 – 44. DOI: 10.3852/mycologia.97.1.33
- Antunes, L., Martins, L., Pereira, R., Maltez, A., Deibs, B., Nascimento, L., Machaco, G., Silva, L., Condomitti, G., Digiampietri, L., Lombardi, K., Locosque, P., Bento, R., Franco, J., Castiglioni, R., Batista, J., da Silva, A. y Setubal, J. (2016). Microbial community structure and dynamics in thermophilic composting viewed through metagenomics and metatranscriptomics. *Scientific Reports*. 6, 1 – 12. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep38915>
- Ardhi, M., Sulistyarsi, A. y Pujiati, P. (2017). The production and activity test of cellulases using bagasse substrate on *Aspergillus niger* isolated from Clove field, Kare, Madiun. *AIP Publishing*. 1854(1), 1 – 10. DOI: 10.1063/1.4985393
- Arévalo, A. (2011). *Evaluación de la actividad celulolítica de microorganismos aislados a partir de fuentes de biomasa lignocelulósica*. [Tesis de Grado, Universidad Francisco de Paula Santander]. Repositorio Institucional de la Biblioteca Eduardo Cote Lemus. URL: [https://catalogobiblioteca.ufps.edu.co/cgi-bin/koha/opacdetail.pl?biblionumber=37260&shelfbrowse\\_itemnumber=76914](https://catalogobiblioteca.ufps.edu.co/cgi-bin/koha/opacdetail.pl?biblionumber=37260&shelfbrowse_itemnumber=76914)
- Arja, M. (2007). Cellulases in the Textile Industry. Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications. En Polaina, J. y MacCabe, A. *Industrial Enzymes*. (51 – 63). Springer Netherlands. URL: <https://enzimo.files.wordpress.com/2012/09/industrial-enzymes-structure-function-and-applications.pdf>

Aruani, M. C.; Gili, P.; Machuca, Y.; Spera, N. (2012). Evaluación de las características fisicoquímicas y biológicas en dos suelos superficiales cultivados con pera (*Pyrus communis* L.) cv. Williams bajo manejo convencional. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina.* 44(1), 77-84.

URL: <https://revistas.uncu.edu.ar/ojs3/index.php/RFCA/article/view/6242>

Baig S. y Saleem M. (2012). Production and Characterization of Cellulases of *Aspergillus Niger* by using Rice Husk and Saw Dust as Substrates. *Pakistan Journal of Botany,* 44(1), 377 – 382.

URL: [http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/44\(SI1\)/57.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/44(SI1)/57.pdf)

Bairagi, S. y Rohtak, H. (2016). Optimization of Cellulase Enzyme from Vegetable Waste by Using *Trichoderma atroviride* in Solid State Fermentation. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology,* 10(5), 68 – 73. DOI: 10.9790/2402-1005026873

Barnett, HL y Hunter, BB (1972) Géneros ilustrados de hongos imperfectos. 3ª edición, Burgess Publishing, Minneapolis

Bilal, L., Asaf, S., Hamayun, M., Gul, H., Iqbal, A., Ullah, I. y Hussain, A. (2018). Plant growth promoted by endophytic fungi *Aspergillus fumigatus* TS1 and *Fusarium proliferatum* BRL1 produce gibberellins and regulate endogenous plant hormones. *Symbiosis.* 76(1), 117-127.

URL:[https://www.researchgate.net/publication/323152225\\_Plant\\_growth\\_promoting\\_endophytic\\_fungi\\_Aspgillus\\_fumigatus\\_TS1\\_and\\_Fusarium\\_proliferatum\\_BRL1\\_produce\\_gibberellins\\_and\\_regulates\\_plant\\_endogenous\\_hormones](https://www.researchgate.net/publication/323152225_Plant_growth_promoting_endophytic_fungi_Aspgillus_fumigatus_TS1_and_Fusarium_proliferatum_BRL1_produce_gibberellins_and_regulates_plant_endogenous_hormones)

- Behnam, S., Karimi, K. y Khanahmadi, M. (2019). Cellulase Production Under Solid-State Fermentation by Ethanolic Zygomycetes Fungi: Application of Response Surface Methodology. *Nutrition and Food Sciences Research*. 6(1), 27 – 34. DOI: 10.29252/nfsr.6.1.27
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248 – 254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999
- Brienzo, M., Arantes, V. y Milagres, A. (2008). Enzymology of the thermophilic ascomycetous fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Fungal biology reviews*. 22(3), 120 – 130. DOI: 10.1016/j.fbr.2009.04.001
- Bonilla, N. (2020). *Optimización de la producción de celulasa a partir de Fusarium sp.* [Tesis de Grado, Universidad Nacional de Colombia]. Repositorio Institucional de la Universidad Nacional de Colombia.  
URL:  
<https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/unal/81428/5/1107036049.2020.pdf>
- Buenrostro, O., Cram, S., Bernache, G. y Bocco, G. (2000). La digestión anaerobia como alternativa de tratamiento a los residuos sólidos orgánicos generados en los mercados municipales. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 16(1), 19 – 26.  
URL:[https://www.researchgate.net/publication/26474704\\_La\\_digestion\\_anaerobia\\_como\\_alternativa\\_de\\_tratamiento\\_a\\_los\\_residuos\\_solidos\\_organicos\\_generados\\_en\\_los\\_mercados\\_municipales](https://www.researchgate.net/publication/26474704_La_digestion_anaerobia_como_alternativa_de_tratamiento_a_los_residuos_solidos_organicos_generados_en_los_mercados_municipales)

- Busk, P. y Lange, L. (2013). Cellulolytic potential of thermophilic species from four fungal orders. *AMB Express*. 3(47), 1 – 10. DOI: <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-47>
- Camacho, A., Martínez, L., Ramírez, H., Valenzuela, R. y Valdés, M. (2014). Potential of Different Microorganisms for Solid Waste Composting. *Terra Latinoamericana*. 32(4), 291 – 230.  
URL: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-57792014000400291&lng=es&tlng=](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792014000400291&lng=es&tlng=)
- Campbell, N y Reece, J. (2007). *Biología* (7ª ed.). Editorial Médica Panamericana.  
URL:  
<https://books.google.com.co/books?id=QcU0yde9PtkC&printsec=copyright>
- Cañedo, V. (2004). *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos*. Centro Internacional de la Papa (CIP).  
URL: <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf>
- Carrasco, M., Villareal, P., Barahona, S., Alcaíno, J., Cifuentes, V. y Baeza, M. (2016). Screening and characterization of amylase and cellulase activities in psychrotolerant yeasts. *BMC Microbiology*. 16(21). 1 – 9. DOI: 10.1186/s12866-016-0640-8
- Chaparro, D., Rosas, D. y Varela, A. (2009). *Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madero (Quindío, Colombia)*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 26(4). 238 – 243.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.riam.2009.03.005>
- Cortez, B. (2015). *Aislamiento de microorganismos productores de celulasas alcalinas de aguas termales y suelos de bosques de Contamana*. [Tesis de pre grado,

Universidad de la Amazonía Peruana]. Repositorio Institucional de la Universidad de la Amazonía Peruana.

URL:[https://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12737/4124/Bernardina\\_Tesis\\_T%  
c3%adtulo\\_2015.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12737/4124/Bernardina_Tesis_T%c3%adtulo_2015.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Dávila, G. y Vázquez, R. (2006). Enzimas lignolíticas fúngicas para fines ambientales. *Mensaje Bioquímico*. 30, 29 – 55.

URL:[https://www.researchgate.net/publication/259781170\\_Enzimas\\_ligninolitic  
s\\_fungicas\\_para\\_fines\\_ambientales](https://www.researchgate.net/publication/259781170_Enzimas_ligninolitic<br/>s_fungicas_para_fines_ambientales)

De Hoog, G.S., Guarro J., Gené J. y Figueras M. (2020). Atlas of Clinical Fungi, 4th ed. Utrecht, The Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.

Di Piazza, S., Houbraken, J., Meijer, M., Cecchi, G. Kraak, B., Rosa, E. y Zotti, M. (2020). Thermotolerant and Thermophilic Mycobiota in Different Steps of Compost Maturation. *Microorganisms*. 8(6), 1 – 9. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060880>

Do Nascimento, A., De Paula, A., Busato, J., Da Silva, S. y Texeira, A. (2023). Prospection of Cellulolytic Fungi from Composted Samples of Saturated Horse Litter. *Agriculture*. 13(7), 1 – 10. DOI: <https://doi.org/10.3390/agriculture13071308>

Effiong, T., Abdulsalami, M., Egbe, N. y Bakare, B. (2019). Screening of fungi isolates from soil, pulp waste water and rotten wood for cellulase producing potentials. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*. 23(6), 1051 – 1055. DOI: 10.4314/jasem.v23i6.8

El-Baroty, G., Abou-Elella, F., Moawad, H., El-Sebai, T., Abdulaziz, F. y Khattab, A. (2019). Optimization and Characterization of Extracellular Cellulase Produced by

Native Egyptian Fungal Strain. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanic Cluj-Napoca*. 47(3), 743 – 750.

URL: <https://www.notulaebotanicae.ro/index.php/nbha/article/view/11500/8794>

Ellila, S., Fonseca, L., Uchima, C., Cota, J., Goldman, G., Saloheimo, M., Sacon, V. y Siika-aho, M. (2017). Development of a low-cost cellulase production process using *Trichoderma reesei* for Brazilian biorefineries. *Biotechnology for biofuels*. 10(1), 1 – 17. DOI: 10.1186/s13068-017-0717-0

Emtiazi, G., Naghavi, N. y Bordhar, A. (2001). Biodegradation of lignocellulosic waste by *Aspergillus terreus*. *Biodegradation*. 12, 259 – 263.

URL: <https://sci-hub.3800808.com/10.1023/a:1013155621336>

Escudero, J., Daza, T., Zapata, N. y Mora, O. (2013). Evaluación de las enzimas celulolíticas producidas por hongos nativos mediante fermentación en estado sólido (SSF) utilizando residuos de cosecha de caña de azúcar. *Revista de Biotecnología*. 15(1), 108 – 117.

URL: <https://www.redalyc.org/pdf/776/77628609011.pdf>

Ezeonuegbu, B., Abdullahi, M., Whong, Z., Sohunago, J., Kassem, H., Yaro, C., Hetta, H., Mostafa-Hedeab, G., Zouganells, G. y Batiha, G. (2022). Characterization and phylogeny of fungi isolated from industrial wastewater using multiple genes. *Scientific Reports*. 12(2094), 1 – 11. DOI: 10.1038/s41598-022-05820-9

Ferbiyanto, A., Rusmana, I., y Raffiudin, R. (2015). Characterization and identification of cellulolytic bacteria from gut of worker *Macrotermes gilvus*. *HAYATI Journal of Biosciences*. 22(4), 197 – 200. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hjb.2015.07.001>

Ferrer, M., León, M. y Michelena, A. (2011). Selección de hongos aislados de bagazo de caña con actividad celulasa sobre celulosa cristalina para posibles aplicaciones industriales. *Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar*. 45(1), 3 – 12.

URL: <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223122251001.pdf>

Fortes, L., Oliveira, R. y Silva, E. (2010). Cellulases, xylanases,  $\beta$ -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. *Biochemical Engineering Journal*. 51(1 – 2), 72 – 78. DOI: 10.1016/j.bej.2010.05.003

Gabiatti, J., Vendruscolo, F., Zanchet, J., Costa, R., Durrant, L. y Vieira, J. (2005). Radial growth rate as a tool for the selection of filamentousfungi for use in bioremediation. *Brazilian Arichves of Biology and Technology*. 47(5), 35 – 40.

URL:[https://www.researchgate.net/publication/286745815\\_Radial\\_growth\\_rate\\_as\\_a\\_tool\\_for\\_the\\_selection\\_of\\_filamentous\\_fungi\\_for\\_use\\_in\\_bioremediation](https://www.researchgate.net/publication/286745815_Radial_growth_rate_as_a_tool_for_the_selection_of_filamentous_fungi_for_use_in_bioremediation)

Gaitan, D y Pérez, L. (2007). *Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (Dendranthema grandiflora)*. [Tesis de Grado, Pontificia Universidad Javeriana]. Repositorio Institucional de la Pontificia Universidad Javeriana.

URL: <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8296>

Ghose, T.K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure. Appl.Chem*, 59(2),257-268

Gilchrist, S., Fuentes, G., Martínez, M., López, E., Duveiller, P., Singh, H. y García A. (2005). *Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada*. CIMMYT. URL: <https://repository.cimmyt.org/handle/10883/1272>

- Gilna, V.V. y Khaleel, K.M. (2011). Cellulase Enzyme activity of *Aspergillus fumigatus*. *Recent Research in Science and Technology*. 3(1), 132-134  
URL:[https://www.researchgate.net/publication/266457009\\_Cellulase\\_enzyme\\_activity\\_of\\_AspERGILLUS\\_fumigatus\\_from\\_mangrove\\_soil\\_on\\_lignocellulosic\\_substrate](https://www.researchgate.net/publication/266457009_Cellulase_enzyme_activity_of_AspERGILLUS_fumigatus_from_mangrove_soil_on_lignocellulosic_substrate)
- Grigorevski-Lima, A.L., Da Vinha, F.N., Souza, D.T., Bispo, A., Bon E., Coelho, R., y Nascimento, R. (2009). *Aspergillus fumigatus* thermophilic and acidophilic endoglucanases. *Appl Biochem Biotechnol*.155(1-3), 321. DOI: 10.1007/s12010-008-8482
- Gupta, P. y Kumar, A. (2019). An Update on Overview of Cellulose, Its Structure and Applications. *Cellulose*.
- Guzmán, A., Zambrano, D., Rondón, A., Silva, M., Pérez, M., León, R. y Rivera, R. (2014). *Aislamiento, selección y caracterización de hongos celulolíticos a partir de muestras de suelo en Manabí – Ecuador*. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias Uncuyo. 46(2), 177 – 189.  
URL:[https://www.researchgate.net/publication/296763676\\_Isolation\\_selection\\_and\\_characterization\\_of\\_cellulolytic\\_fungi\\_from\\_soil\\_samples\\_in\\_Manabi-Ecuador](https://www.researchgate.net/publication/296763676_Isolation_selection_and_characterization_of_cellulolytic_fungi_from_soil_samples_in_Manabi-Ecuador)
- Halimah, N., Baktir, A. y Purkan P. (2019). Exploration of Cellulolytic Microorganism as A Biocatalyst Candidate for Liquid Fertilizer Production. *IOP Conference Series Earth and Environmental Science*. Brasil. 217(1), 1 – 10. DOI: 10.1088/1755-1315/217/1/012021

- Hammad, A., Abo-State, M., Swelim, M. y Gannam, R. (2010). Enhanced production of cellulase (S) by *Aspergillus* spp. isolated from agriculture wastes by solid state fermentation. *Journal of Agricultural and Environmental Science*. 8(4), 402 – 410.  
URL: [https://www.idosi.org/aejaes/jaes8\(4\)/7.pdf](https://www.idosi.org/aejaes/jaes8(4)/7.pdf)
- El-Hefnawy, M.A., Attia, M., El-Hofy M.E. y Ali, S.M. (2015) Optimization production of L-asparaginase by locally isolated filamentous fungi from Egypt. *Current Science International*, 4(3), 330-341. URL: <https://www.curreweb.com/csi/csi/2015/330-341.pdf>
- Henaó, I., Franco, M., Marín, G. (2006). Evaluación de métodos de conservación para *Aspergillus niger* con actividad enzimática amilolítica. *Scientarium*. 11(2), 52-60  
URL: <https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/article/view/4970>
- Herrera, T., Ulloa, M. y Ruiz, M. (2005). *El Reino de Los Hongos: Micología Básica y Aplicada*. Universidad Nacional Autónoma de México.  
URL: [https://books.google.com/books/about/El\\_reino\\_de\\_los\\_hongos.html?id=MvdEAAAAYAAJ](https://books.google.com/books/about/El_reino_de_los_hongos.html?id=MvdEAAAAYAAJ)
- Hölker, U., Höfer, M. y Lenz, J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64(2), 175 – 186. DOI: 10.1007/s00253-003-1504-3
- Houbraken, J., Uwe, M. y Oliver, M. (2016). *Aspergillus oerlinghausenensis*, una nueva especie de moho estrechamente relacionada con *A. fumigatus*. *FEMS Microbiology Letters*. 363 (3). DOI: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv236>
- Hu, L., Fang, X., Du, M. y Luo, F. (2020). Hemicellulose-Based Polymers Processing and Application. *American Journal of Plant Sciences*. 11(12), 2066 – 2079.

DOI: 10.4236/ajps.2020.1112146

Ike, M. y Ken T. (2018). Cellulase production of *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) by continuously fed cultivation using sucrose as primary carbon source. *Journal of Applied Glycoscience*. 65(4), 51 – 56.

DOI: [https://doi.org/10.5458/jag.jag.JAG-2018\\_0005](https://doi.org/10.5458/jag.jag.JAG-2018_0005)

Immanuel, G., Bhagavath, C., Raj, P.I., Esakkiraj, P. y Palavesam, A. (2007). Production and partial purification of cellulase by *Aspergillus niger* and *Aspergillus fumigatus* fermented in coir waste and saw dust. *The Internet Journal of Microbiology*. 3 (1), 147-152. DOI: 10.5580/49

Ioelovich, M. (1999). Concept of Structural Organization of Native Cellulose. *Scientific Israel – Technological Advances*. 1, 68 – 77.

URL:[https://www.academia.edu/6772836/Concept\\_of\\_Structural\\_Organization\\_of\\_Native\\_Cellulose](https://www.academia.edu/6772836/Concept_of_Structural_Organization_of_Native_Cellulose)

Isaac, G. y Abu-Tahon, M. (2015) Enhanced alkaline cellulases production by the thermohalophilic *Aspergillus terreus* AUMC 10138 mutated by physical and chemical mutagens using corn stover as substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*. 46(4), 1269 – 1277. DOI: 10.1590/S1517-838246420140958

Jahangeer, S., Khan, N., Jahangeer, S. y Sohail, M. (2005). Screening and characterization of fungal cellulases isolated from the native environmental source. *Pakistan Journal of Botany*. 37(3), 739 – 748.

URL:[https://www.researchgate.net/publication/215589030\\_Screening\\_and\\_characterization\\_of\\_fungal\\_cellulases\\_isolated\\_from\\_the\\_native\\_environmental\\_source](https://www.researchgate.net/publication/215589030_Screening_and_characterization_of_fungal_cellulases_isolated_from_the_native_environmental_source)

e

- Jayasekara, S. y Ratnayake R. (2019). Microbial Cellulases: An overview and applications. *En Rodriguez, A. y Eugenio, M. (Eds.), Cellulose. 1 – 3.* DOI: 10.5772/intechopen.84531
- Jecu, Luiza. (2000). Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. *Industrial Crops and Products. 11(1), 1 – 5.* DOI: 10.1016/S0926-6690(99)00022-9
- Kamble, R. y Jadhav, A. (2012). Isolation, purification, and characterization of xylanase produced by a new species of *Bacillus* in solid state fermentation. *International Journal of Microbiology. 2012, 1 – 8.* DOI: 10.1155/2012/683193
- Kannahi, M. y Elangeswari, S. (2015). Enhanced production of cellulase on different fruit peel under submerged fermentation. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. 32(2), 161 – 165.*  
URL: [https://www.researchgate.net/publication/283108098\\_Enhanced\\_production\\_of\\_cellulase\\_on\\_different\\_fruit\\_peel\\_under\\_submerged\\_fermentation](https://www.researchgate.net/publication/283108098_Enhanced_production_of_cellulase_on_different_fruit_peel_under_submerged_fermentation)
- Karmakar, M. y Ray, R. (2011). Current trends in research and application of microbial cellulases. *Research Journal of Microbiology. 6(1), 41 – 53.*  
URL: <https://scialert.net/abstract/?doi=jm.2011.41.53>
- Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S. y Gulati, A. (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current Microbiology. 57, 503 – 507.* DOI: 10.1007/s00284-008-9276-8
- Keng, Z. Minn, T., Lee, B., Chang, C., Khoiroh, I., Chong, S. Supramaniam, C., Singh, A. y Pan, G. (2023). Aerated Static Pile Composting for Industrial Biowastes: From

- Engineering to Microbiology. *Bioengineering*. 10(8), 1 – 16. DOI: 10.3390/bioengineering10080938
- Kiio, I., Jackim, M., Munyali, W. y Muge, E. (2016). Isolation and Characterization of a Thermostable Cellulase from *Bacillus licheniformis* Strain Vic Isolated from Geothermal Wells in the Kenyan Rift Valley. *The Open Biotechnology Journal*, 10(1), 198 – 207. DOI: 10.2174/1874070701610010198
- Kogo, T., Yoshida, Y., Koganei, K., Matsumoto, H., Watanabe, T., Ogihara, J. y Kasumi, T. (2017). Production of rice Straw hydrolysis enzymes by the fungi *Trichoderma reesei* and *Humicola insolens* using rice straw as a carboun source. *Bioresource Technology*. 233, 67 – 73. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.01.075
- Lee, C., Darah, I., Ibrahim, C. (2011). Production and optimization of cellulase enzyme using *Aspergillus niger* USM AI 1 and comparison with *Trichoderma reesei* via Solid State Fermentation System. *Biotechnology Research International*. 2011, 1 – 6. DOI: 10.4061/2011/658493
- Lee, H., Lee, Y., Jang, Y., Lee, S., Lee., H., Jun, B., Kim, G. y Kim, J. (2014). Isolation and Analysis of the Enzymatic Properties of Thermophilic Fungi from Compost. *Mycobiology*. 42(2), 181 – 184. DOI: 10.5941/MYCO.2014.42.2.181
- Libardi, N. Soccol, C., Góes, A., Oliveira, J. y Porto de Souza, L. (2017). Domestic wastewater as substrate for cellulase production by *Trichoderma harzianum*. *Process Biochemistry*. 57. 190 – 99. DOI: 10.1016/j.procbio.2017.03.006
- Lincoln, T. y Zeiger, E. (2006). *Fisiología Vegetal*. Editorial Sinauer Associates.  
URL: <https://fisiologiavegetalundec.files.wordpress.com/2018/04/fv-taiz-zeiger-vol-i.pdf>

- Lizarraga, E., Haro, D. & Cordova, L. (2020). Fermentación de residuos de café con *Aspergillus niger* para la producción de celulasa. *Revista de Innovación y Transferencia Productiva*. 1(1). 1 – 14. URL: <https://revistas.itp.gob.pe/index.php/ritp/article/view/8/24>
- Llacza, H., Castellanos, P. & Meza, P. (2021). Evaluación del complejo celulasa en hongos nativos del Perú. *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Minas, Metalurgia y Ciencias Geográficas*. 24(48). 323 – 328. DOI: <https://doi.org/10.15381/iigeo.v24i48.21784>
- Lübeck, M., Lübeck, P.S. (2018). Isolation and Screening of Cellulolytic Filamentous Fungi. *Methods in Molecular Biology*. 1796. 37 – 45. DOI: 10.1007/978-1-4939-7877-9\_3
- Machado de Castro, A. y Pereira, J. (2010). Production, properties and application of cellulases in the hydrolysis of agroindustrial residues. *Química Nova*, 33(1), 181 – 188. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000100031>
- Maheshwari R, Bharadwaj G, Bhat MK (2000) Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64(3). 461 – 488. DOI: 10.1128/mubr.64.3.461-488.2000
- Martínez, C., Balcázar, E., Dantán, E., Folch, J. (2008). Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 50(3-4). 119 – 131. URL: [https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2008/mi08-3\\_4i.pdf](https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2008/mi08-3_4i.pdf)
- Mehboob, N., Javaid, M., Asgher, M., Gulfraz, M., Mukhtar, T. & Tahir, R. (2014). Exploring Thermophilic Cellulolytic Enzyme Production Potential of *Aspergillus*

- fumigatus by the Solid-State Fermentation of Wheat Straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 172(7). 3646 – 3655. DOI: 10.1007/s12010-014-0796-3
- Mohammed, I y Fagade, O. (2010). Optimization studies on cellulase enzyme production by an isolated strain of *Aspergillus niger* YL128. *African Journal of Microbiology Research*. 4(24). 2635 – 2639.
- URL:[https://www.researchgate.net/publication/279559495\\_Optimization\\_studies\\_on\\_cellulase\\_enzyme\\_production\\_by\\_an\\_isolated\\_strain\\_of\\_AspERGILLUS\\_niger\\_YL128](https://www.researchgate.net/publication/279559495_Optimization_studies_on_cellulase_enzyme_production_by_an_isolated_strain_of_AspERGILLUS_niger_YL128)
- Mojssov, K. D. (2016). “Capítulo 16 - Enzimas de *Aspergillus* sp. para la industria alimentaria” *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. 215 – 222. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63505-1.00033-6>
- Morgenstern, I., Powlowski, J., Ishmael, N., Darmond, C., Marquetteau, S., Moisan M, Quenneville G, Tsang A. (2012). A molecular phylogeny of thermophilic fungi. *Fungal Biol* 116(4):489–502. DOI:10.1016/j.funbio.2012.01.010
- Mrudula, Soma y Murugammal, R. (2011). Production of cellulase by *Aspergillus niger* under submerged and solid-state fermentation using coir waste as a substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(3), 1119-1127. DOI: 10.1590/S1517-838220110003000033
- Najeeb, K., Nawal, N., Febri, D., Wedad, H., Aidil, A., Mhod, S. y Wan, W. (2015). Optimization of FPase activity using sorghum straw planted in Malaysia by *Aspergillus terreus* SUK-1 via solid substrate fermentation. *Biotechnology*, 14(1), 23 – 28. DOI: 10.3923/biotech.2015.23.28

- Nguyen, T., Dang, H. & Nguyen, M. (2021). Isolation of cellulolytic fungi and their application for production of organic fertilizer from water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Biotech Studies*. 30(1). 17 – 22. DOI: <https://doi.org/10.38042/biost.2021.30.01.03>
- Nisar, K., Abdullah, R., Kaleem, A., Iqtedar, M., Aftab, M. y Saleem, F. (2022). Purification, characterization and thermodynamic analysis of cellulases produced from *Thermomyces dupontii* and its industrial applications. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 29(12). 1 – 10.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103483>
- Ojumu, T.V.; Solomon, B.O.; Betiku, E.; Layokun, S.K.; Amigun, B. (2003). Cellulase production by *Aspergillus flavus* linn isolate NSPR 101 fermented in saw dust, bagasse and corncob. *Afr. J. Biotechnol.* 2(6),150-152. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJB2003.000-1030>
- Okoye, I., Ezugwu, A., Udenwobe, D., Eze, S., Anyawu, C., Chilaka, F. (2013). Producción y caracterización parcial de celulasas de *Aspergillus fumigatus* utilizando dos partes distintas de mazorca de maíz como fuente de carbono. *Revista Nigeriana de Biotecnología*. 26. 50-59.  
URL: <https://www.ajol.info/index.php/njb/article/view/103385>
- Omojasola, P., Jilani, O., y Ibiyemi, S. (2008). Cellulase Production by some Fungi Cultured on Pineapple Waste. *Nature and Science*. 6(2), 64 – 79.  
URL: [https://www.sciencepub.net/nature/0602/07\\_0393\\_Omojasola\\_ns.pdf](https://www.sciencepub.net/nature/0602/07_0393_Omojasola_ns.pdf)
- Ovando-Chacón, S. y Waliszewski, K. (2005). Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y ciencia*. 21(42). 113 – 122.

URL: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=15404206>

- Partanen, P., Hultman, J., Paulin, L., Auvinen, P. y Romantschuk, M. (2010). Bacterial diversity at different stages of the composting process. *BMC Biotechnology*. 10(94). 1 – 11. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-94>
- Pitt, J., Hocking, A. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. 2ª edición. Boston, MA: Springer
- Price, M., Dehair, P. y Arkin, A. (2010). FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. *Plos One*. 5(3). 1 – 12. DOI: [10.1371/journal.pone.0009490](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490)
- Rakilla, A., Kellu, H., Akinmusire, O. y Abba, A. (2024). Isolation and Morphological Identification of *Aspergillus* Species from Some Cultivated Soils in Maiduguri, Nigeria 1. *Research Journal of Microbiology*. 19(1). 1 – 7. DOI: <https://doi.org/10.3923/rjm.2024.1.8>
- Raper, K.B., Fennell, D.I. (1965). *The Genus Aspergillus*. Baltimore, The Williams and Wilkins company.
- Ramírez, P. y Cocha, J. (2003). Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. *Revista Peruana de Biología*. 10(1). 67 – 77. URL: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v10n1/v10n1a08.pdf>
- Rangel, S. (2012). *Estudio del efecto de enzimas ligninolíticas y celulolíticas obtenidas del hongo *Pleurotus ostreatus* sobre una gramínea forrajera tropical*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia]. Repositorio de la Universidad Nacional de Colombia.

URL:[https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/11428/sandraximenara\\_ngelortega.2012.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/11428/sandraximenara_ngelortega.2012.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

- Raut, M., Prince, S., Bhattacharyya, J., Chakrabarti, T. y Devotta, S. (2008). Microbial dynamics and enzyme activities during rapid composting of municipal solid waste – A compost maturity analysis perspective. *Bioresource Technology*. 99(14). 6512 – 6519. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.030>
- Ravindran, R., Hassan, H., Williams, G. y Jaiswa, A. (2018). A Review on Bioconversion of Agro-Industrial Wastes to Industrially Important Enzymes. *Bioengineering*. 5(4). 1 – 20. DOI: [10.3390/bioengineering5040093](https://doi.org/10.3390/bioengineering5040093)
- Reyes, A. y Aguilar, G. (2011). Residuos agroindustriales para la producción de proteasas fúngica. *Ciencia cierta*. 27. 1 – 6. URL: <https://es.scribd.com/doc/194465471/Articulo-para-bioquimica>
- Ryckeboer, J., Mergaert, J., Coosemans, J., Deprins, K. y Swings, J. (2003). Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. *Applied Microbiology*. 94(1). 127 – 137. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01800.x>
- Sajith, S. (2016). An Overview on Fungal Cellulases with an Industrial Perspective. *Journal of Nutrition y Food Sciences*. 6(1). 1 – 13. DOI: [10.4172/2155-9600.1000461](https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000461)
- Samson, R., Hoekstra, E., Frisvad, J. (2000). Introduction to Food- and Airborne Fungi. The Netherlands. *CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre*.
- Samson, R., Hoekstra, E. y Frisvad, J. (2004) Introducción a los hongos transmitidos por los alimentos y el aire. 7ª edición.

- Sánchez, T. (2009). Caracterización microbiológica del proceso de compostaje a partir de residuos azucareros microbial. *Agronomía Tropical*. 59(3). 1 – 5.  
URL:[http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0002-92X2009000300007](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-92X2009000300007)
- Saroj, P., Manasa, P. y Narasimhulu, K. (2018). Characterization of thermophilic fungi producing extracellular lignocellulolytic enzymes for lignocellulosic hydrolysis under solid-state fermentation. *Bioresources and Bioprocessing*. 5(31). 1 – 14.  
URL:<https://bioresourcesbioprocessing.springeropen.com/counter/pdf/10.1186/s40643-018-0216-6.pdf>
- Sena, A., Gildomar, L. Goes, N., Taranto, A., Pirovani, P., Cascardo J., Zingali, R., Bezerra M. y Assis S. (2011). Production, purification and characterization of a thermostable  $\beta$ -1,3-glucanase (laminarinase) produced by *Moniliophthora perniciosa*. *Academia Brasileira de Ciencias*. 83(2). 599 – 609. DOI: 10.1590/s0001-37652011005000007
- Serna, F., Barrera, L. y Montiel, H. (2011). Impacto social y económico en el uso de biocombustibles. *Journal of Technology Management & Innovation*. 6(1). 100-114. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-27242011000100009>
- Sethi, B., Satapathy, A., Kumar, S. y Dash, A. (2016). Production of Cellulase by *Aspergillus niger* NCFT 4263.10 using Agro waste as a Substrate. *International Journal of Biology Research*. 1(2). 23 – 27.  
URL:[https://www.researchgate.net/publication/301693048\\_Production\\_of\\_Cellulase\\_by\\_Aspergillus\\_niger\\_NCFT\\_426310\\_using\\_Agro\\_waste\\_as\\_a\\_Substrate](https://www.researchgate.net/publication/301693048_Production_of_Cellulase_by_Aspergillus_niger_NCFT_426310_using_Agro_waste_as_a_Substrate)

- Sharada, R., Venkateswarlu, G., Venkateswar, S. y Anandrao, M. (2014). Applications of cellulases-review. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences*, 4(2). 424 – 437. URL: <https://www.ijpcbs.com/articles/applications-of-cellulases--review.pdf>
- Sharma, A. (2019). Chapter 2 - Cellulose as Potential Feedstock for Cellulase Enzyme Production: Versatility and Properties of Various Cellulosic Biomasses en Srivastava, N., Srivastava, M., Mishra, P., Ramteke, P. y Lakhan, R. (Eds.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. (11 – 27). Elsevier. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64223-3.00002-3>
- Sherief, A.A., El-Tanash, A. y Atia, N., (2010). Cellulase production by *Aspergillus fumigatus* grown on mixed substrate of rice straw and wheat bran. *Research Journal Microbiology*. 5(1). 199 – 211. URL: <https://scialert.net/abstract/?doi=jm.2010.199.211>
- Siqueira, J. G. W., Teixeira, N. A., Vandenberghe, L. P. S., Oliveira, P. Z., Soccol, C. R., & Rodrigues, C. (2020). Update and Revalidation of Ghose's Cellulase Assay Methodology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 191(3), 1271-1279. DOI: 10.1007/s12010-020-03291-0
- Sohail M., Siddiqi R., Ahmad A., Ahmed S. (2009). Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. *New Biotechnology*. 25(6). 437 – 441. DOI: 10.1016/j.nbt.2009.02.002
- Soller M., Álvares F., Cirano J., Silva R. (2010). Optimized microplate  $\beta$ -1,3-glucanase assay system for *Trichoderma* spp. screening. *Journal of Microbiological Methods*. 81(1). 6 – 10. DOI: 10.1016/j.mimet.2010.01.010

- Song, J., Shi, L., Wang, S., Wang, Y., Zhu, Y., Jiang, J. & Li, R. (2024). Acid/Alkaline Stress Mediates Responses to Azole Drugs and Oxidative Stress in *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology Spectrum*. 12(3). 2996 – 3023. DOI: <https://doi.org/10.1128/spectrum.02996-23>
- Sridevi, A., Sankararajan, R. y Golla, N. (2011). Pretreatment of ricebran for effective production of cellulase by *Aspergillus niger*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2(4). 536 – 543.  
URL:[https://www.researchgate.net/publication/216022986\\_PRETREATMENT\\_OF\\_RICEBRAN\\_FOR\\_EFFECTIVE\\_PRODUCTION\\_OF](https://www.researchgate.net/publication/216022986_PRETREATMENT_OF_RICEBRAN_FOR_EFFECTIVE_PRODUCTION_OF)
- Srivastava, N., Mishra, P., Gupta, V., Molina, G., Rodríguez-Couto, S., Manikanta, A. y Ramteke, P. (2018). Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 82(3). 2379 – 2386. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.08.074>
- Suárez, L., Peñaranda, F. (2021). Identificación molecular de hongos filamentosos y su potencial biotecnológico. *Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 20(1). 194 – 206. DOI: <https://doi.org/10.18684/rbsaa.v20.n1.2022.1914>
- Suesca, A. (2012). *Producción de enzimas celulolíticas a partir de cultivos de Trichoderma sp., con biomasa lignocelulósica*. [Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia]. Repositorio Institucional de la Universidad Nacional de Colombia  
URL: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/10652>

- Sulyman A., Igunnu A. y Malomo S. (2020). Isolation, purification and characterization of cellulase produced by *Aspergillus niger* cultured on *Arachis hypogaea* shells. *Heliyon*. 6(12). 1 – 10. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e05668
- Talekar S., Ghodake V., Chavare S., Ingle R., Kate A., Magdum S. y Pillai M. (2011). Production and characterization of cellulase by local fungal isolate of india using water hyacinth as carbon source and reuse of fungal biomass for dye degradation. *International Journal of Engineering Science and Technology*. 3(4). 3236 – 3241. URL:[https://www.researchgate.net/publication/232805472\\_PRODUCTION\\_AND\\_CHARACTERIZATION\\_OF\\_CELLULASE\\_BY\\_LOCAL\\_FUNGAL\\_ISOLATE\\_OF\\_INDIA\\_USING\\_WATER\\_HYACINTH\\_AS\\_CARBON\\_SOURCE\\_AND\\_REUSE\\_OF\\_FUNGAL\\_BIOMASS\\_FOR\\_DYE\\_DEGRADATION](https://www.researchgate.net/publication/232805472_PRODUCTION_AND_CHARACTERIZATION_OF_CELLULASE_BY_LOCAL_FUNGAL_ISOLATE_OF_INDIA_USING_WATER_HYACINTH_AS_CARBON_SOURCE_AND_REUSE_OF_FUNGAL_BIOMASS_FOR_DYE_DEGRADATION)
- Tamura, K., Stecher, G. & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*. 38(7). 3022 – 3027. DOI: 10.1093/molbev/msab120
- Teather, R. y Wood, P. (1982). Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*. 43(4). 777 – 780. DOI: 10.1128/aem.43.4.777-780.1982
- Torres, J. y Villegas, F. (2006). *Sistemas de manejo de residuos y efectos en la producción*. Cenicaña. URL: [https://www.cenicana.org/pdf\\_privado/serie\\_tecnica/st\\_35/st\\_35.pdf](https://www.cenicana.org/pdf_privado/serie_tecnica/st_35/st_35.pdf)

- Vásquez, A. (2013). *Producción de xilanasas por Aspergillus sp. en fermentación sumergida y fermentación en medio sólido*. [Tesis de Maestría, Universidad Iberoamericana]. Repositorio Institucional de la Universidad Iberoamericana.  
URL: <http://www.bib.uia.mx/tesis/pdf/015774/015774.pdf>
- Vásquez, M., Valiño, E., Ayala, M. & Folch, J. (2019). Cellulolytic and ligninolytic potential of new strains of fungi for the conversion of fibrous substrates. *Biotechnology Reseach and Innovation*. 3(1). 177 – 186. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biori.2018.11.001>
- Vega, K. (2020). *Aislamiento y selección de hongos productores de celulasas neutro alcalinas a partir de bosque primario*. [Tesis de Pre grado, Universidad Nacional Agraria la Molina]. Repositorio Institucional de la Universidad Agraria la Molina.  
URL:  
<https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/4515/vega-rivera-karin.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Vigneswaran, S., Kandasamy, J. & Hasan, M. (2016). Sustainable Operation of Composting in Solid Waste Management. *Procedia Environmental Sciences*. 35. 408 – 415. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2016.07.022>
- Vilches Paz, L. (2002). Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz. Tesis Biología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas. Lima, Perú.  
URL: [https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UNMS\\_625879549fd42633af49d1b85ad2c8f6/Details](https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UNMS_625879549fd42633af49d1b85ad2c8f6/Details)

- Villena, G. & Gutiérrez, M. (2003). Biopelículas de *Aspergillus niger* para la producción de celulasas: algunos aspectos estructurales y fisiológicos. *Revista Peruana de Biología*. 10(1). 78 – 87.  
URL:[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S172799332003000100009&script=sci\\_abstract](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S172799332003000100009&script=sci_abstract)
- Wabusya, B. y Vicent, S. (2015). Clave de identificación de especies de *Aspergillus* aisladas del maíz y el suelo del condado de Nandi, Kenia. *Avances en Microbiología*. 5(4). DOI:10.4236/aim.2015.54020
- Wang, M.; Wang, X.; Yuncheng, W.; Xiaosong, W.; Jiavin, Z.; Yu, L.; Zhe, C.; Zhongkun, J.; Wei, T.; Jibing, Z. (2022). Effects of thermophiles inoculation on the efficiency and maturity of rice straw composting. *Bioresource Technology*. 354, 127-195  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127195>
- Yoon, L., Gek, C., Adeline, S., Muhamad, F., When, H. (2019). Process intensification of cellulase and bioethanol production from sugarcane bagasse via an integrated saccharification and fermentation process. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 142, p. 107528. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cep.2019.107528>
- Yousofvand, Z.; Jamali, S.; Khateri, H. (2020). Isolation and identification of thermotolerant and thermophilic fungi from soil and compost in Kermanshah province. *Rostaniha*. 21(1). 79-95. DOI: 10.22092/BOTÁNICA.2020.341890.1189

- Zhang, Y.P. y Lynd, L.R. (2005). Regulation of cellulase synthesis in batch and continuous cultures of *Clostridium thermocellum*. *Journal of Bacteriology*. 187(1). 99-106.  
DOI: 10.1128/JB.187.1.99-106.2005
- Zhang Y., Himmel M., Mielenz J. (2006). Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Avances en biotecnología*, 24(5), 48-452.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.03.003>
- Zhang, Xiao-Zhou, e Yi-heng Percival Zhang. (2013). Cellulases: Characteristics, Sources, Production, and Applications. Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers, *John Wiley & Sons Ltd*, p. 131-146. URL: [https://www.researchgate.net/profile/Yasser\\_Abdel-Fattah/publication/257930281\\_Amylases/links/54e96a2e0cf27a6de1102007.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Yasser_Abdel-Fattah/publication/257930281_Amylases/links/54e96a2e0cf27a6de1102007.pdf)

## ANEXOS

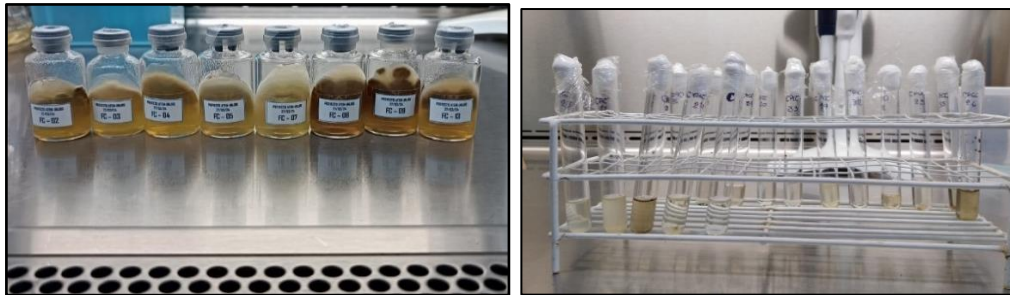
*Anexo 1. Características macroscópicas de los hongos aislados del compost*

<b>Colonia</b>	<b>Borde</b>	<b>Color</b>	<b>Forma</b>	<b>Superficie</b>	<b>Textura</b>	<b>Pigmentación</b>
FC – 2	Lobulado	Blanco	Circular	Plana y extendida	Aterciopelada	Anverso y reverso difusible
FC – 3	Lobulado	Verde opaco	Circular	Plana y extendida	Aterciopelada	Anverso y reverso difusible
FC – 4	Lobulado	Blanco	Circular	Plana y extendida	Aterciopelada	Anverso y reverso difusible
FC – 5	Lobulado	Verde grisáceo	Circular	Rugosa y radiada	Aterciopelada	Anverso y reverso no difusible
FC – 7	Lobulado	Verde grisáceo	Circular	Rugosa y radiada	Aterciopelada	Anverso y reverso no difusible
FC – 8	Lobulado	Verde grisáceo	Circular	Rugosa y radiada	Aterciopelada	Anverso y reverso no difusible
FC – 9	Lobulado	Verde grisáceo	Circular	Rugosa y radiada	Aterciopelada	Anverso y reverso no difusible
FC – 13	Rizoide	Marrón grisáceo	Irregular	Elevada y extendida	Aterciopelada	Anverso y reverso difusible

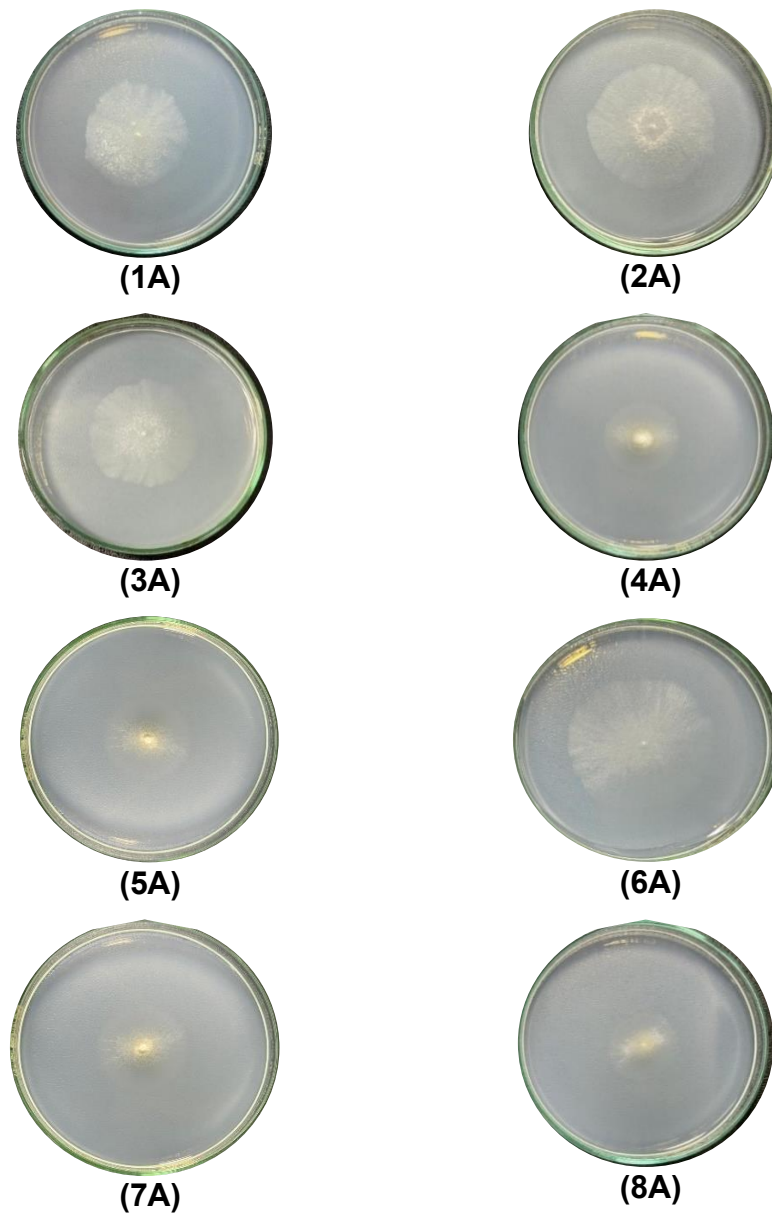
*Anexo 2. Características microscópicas de los hongos aislados del compost*

<b>Colonia</b>	<b>Tinción</b>	<b>Conidióforo</b>	<b>Fiálide</b>	<b>Esporo</b>
FC – 2	Azul de lactofenol	Corto	Forma de botella alargada	Conidios de pared lisa hialina globular
FC – 3	Azul de lactofenol	Corto	Forma de botella alargada	Conidios de pared lisa hialina globular
FC – 4	Azul de lactofenol	Corto	Forma de botella alargada	Conidios de pared lisa hialina globular
FC – 5	Azul de lactofenol	Corto redondeado	Forma de botella	Conidios de pared lisa hialina globular
FC – 7	Azul de lactofenol	Corto redondeado	Forma de botella	Conidios de pared lisa hialina globular
FC – 8	Azul de lactofenol	Corto	Forma de botella alargada	Conidios de forma globular
FC – 9	Azul de lactofenol	Corto	Forma de botella alargada	Conidios de forma globular
FC – 13	Azul de lactofenol	Largo	Forma alargada	Conidios de pared lisa hialina globular

*Anexo 3. Reactivación de cepas de hongos*



*Anexo 4. Crecimiento de hongos aislados del compost en agar CMC*



**Figura 26.** Crecimiento de hongos aislados del compost en Agar con CMC. Vista anverso 1A, 2A, 3A, 4A, 5A, 6A, 7A, 8A (hongos FC-2, FC-3, FC-4, FC-5, FC-7, FC-8, FC-9 y FC-13 respectivamente).

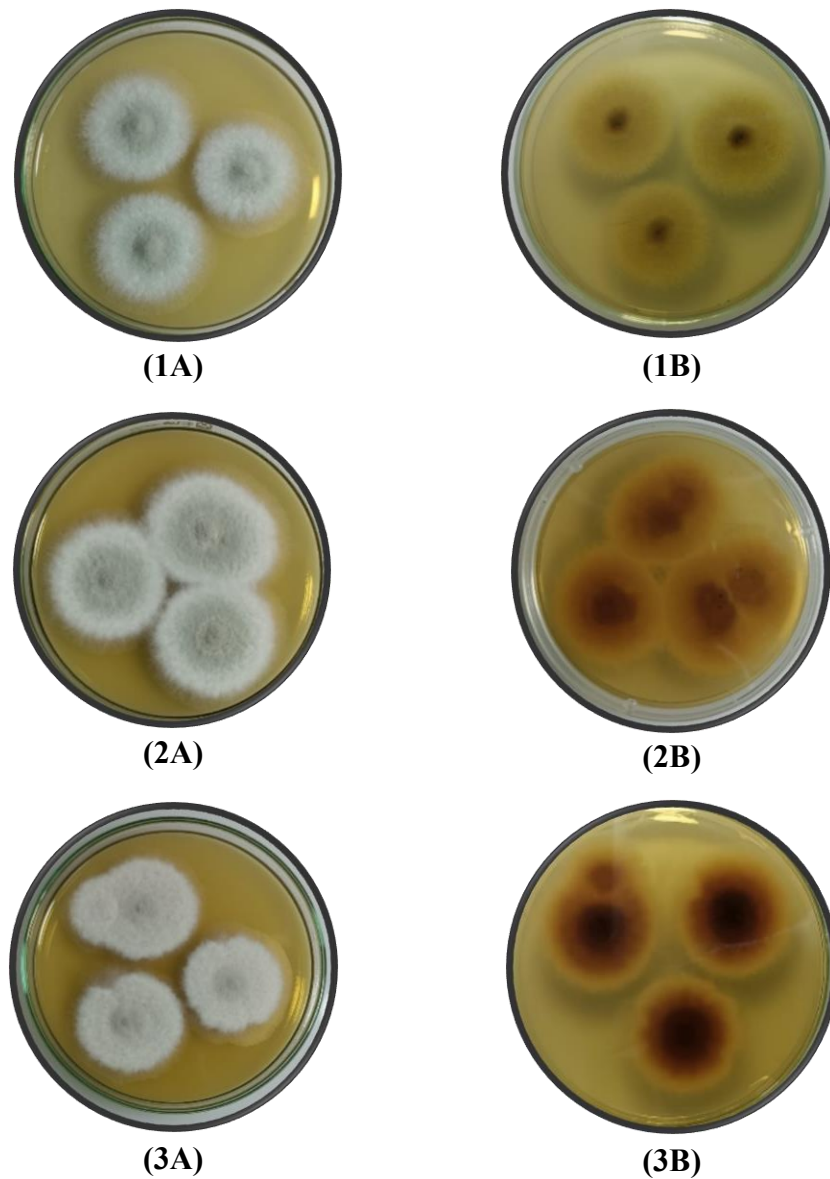
**Tabla 27***Diámetros de crecimiento de colonias en agar con CMC*

Hongo	Diámetro de la colonia (mm)				Desviación estándar
	I	II	III	Promedio	
FC-2	10	9	10	9,67	0,58
FC-3	15	15	15	15,00	0,00
FC-4	11	11	10	10,67	0,58
FC-5	27	27	28	27,33	0,58
FC-7	21	22	21	21,33	0,58
FC-8	29	26	27	27,33	1,53
FC-9	25	24	24	24,33	0,58
FC-13	21	21	22	21,33	0,58

**Tabla 28***Diámetros de crecimiento de colonias con halo en agar con CMC*

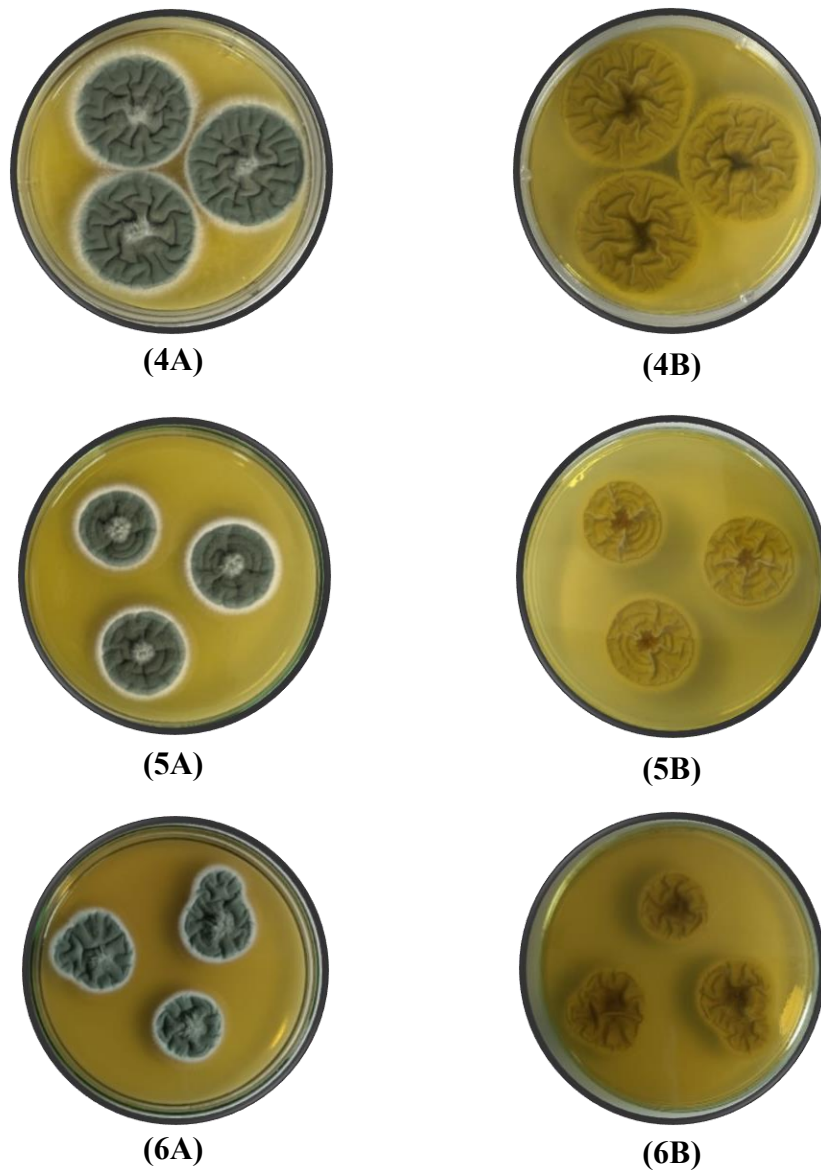
Hongo	Diámetro con el halo (mm)				Desviación estándar
	I	II	III	Promedio	
FC-2	12	12	11	11,67	0,58
FC-3	16	16	17	16,33	0,58
FC-4	12	13	11	12,00	1,00
FC-5	67	68	68	67,67	0,58
FC-7	48	46	47	47,00	1,00
FC-8	59	57	57	57,67	1,15
FC-9	53	52	52	52,33	0,58
FC-13	51	51	53	51,67	1,15

*Anexo 5. Hongos aislados en agar con extracto de levadura sacarosa*

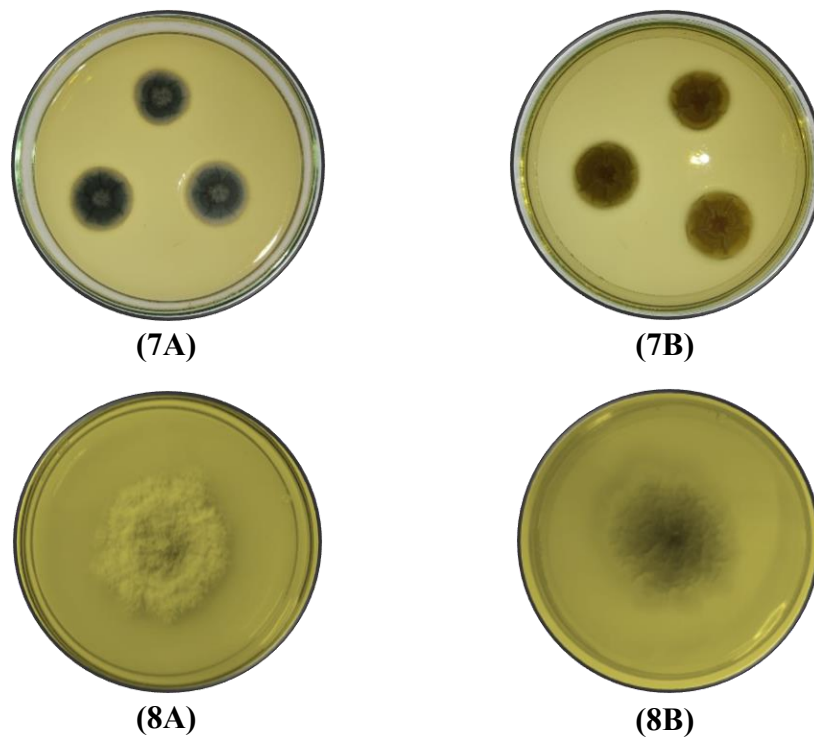


**Figura 27.** Hongos aislados en placas con extracto de levadura sacarosa (YES).

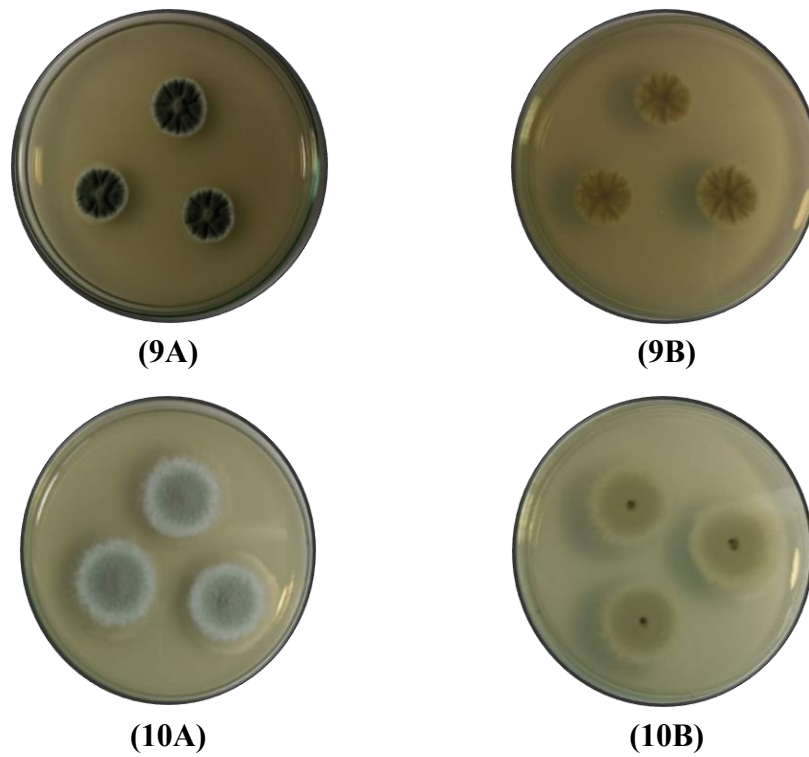
Vista anverso (1A, 2A, 3A) y reverso (1B, 2B, 3B) de las cepas FC-2, FC-3, FC-4; respectivamente.



**Figura 27.** Hongos aislados en placas con extracto de levadura sacarosa (YES). Vista anverso (3A, 4A, 5A, 6A) y reverso (3B, 4B, 5B, 6B) de las cepas FC-4, FC-5, FC-7, FC-8; respectivamente.



**Figura 27.** Hongos aislados en placas con extracto de levadura sacarosa (YES). Vista anverso (7A, 8A) y reverso (7B, 8B) de las cepas FC-9, FC-13; respectivamente.



**Figura 27.** Hongos aislados en placas con agar autolisado de levadura Czapeck (CYA). Vista anverso (9A, 10A) y reverso (9B, 10B) de las cepas FC-5, FC-13; respectivamente.

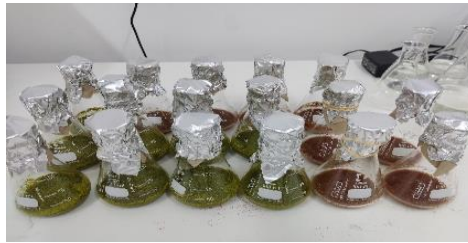
*Anexo 6. Protocolo de extracción de ADN de hongos*

- 1) Se preparará 100 mg de tejido fúngico en un tubo de microcentrífuga de 1,5 o 2 mL.
- 2) Se agregará 600  $\mu$ L de tampón FG1 y pasará por vortex vigorosamente para mezclar. Asegurándose de dispersar todos los grumos.
- 3) Se incubará a 65°C durante 10 minutos y se mezclará la muestra dos veces durante la incubación invirtiendo el tubo.
- 4) Luego se agregará 140  $\mu$ L de tampón FG2, para mezclar bien se usará vortex. Se dejará reposar en hielo durante 5 minutos.
- 5) Se centrifugará a 10 000 x g durante 10 minutos.
- 6) El sobrenadante se transferirá a un nuevo tubo de microcentrífuga, asegurándose de no alterar el sedimento ni transferir residuos.
- 7) Se añadirá 0,7 volúmenes de isopropanol, luego se pasará por vórtice para precipitar el ADN. Inmediatamente se centrifugará a 10 000 x g durante 2 minutos.
- 8) Luego se aspirará y desechará el sobrenadante, asegurándose de no desalojar el sedimento de ADN. Se invertirá el tubo de microcentrífuga sobre una toalla de papel durante 1 minuto para permitir que se drene el líquido residual. No será necesario secar el sedimento de ADN.
- 9) Se agregará 300  $\mu$ L de agua desionizada estéril calentado a 65°C, para resuspender el sedimento se usará vortex.
- 10) Se agregará 4  $\mu$ L de RNase A, y se usará vortex para mezclar bien.
- 11) Del tampón FG3 se agregará 150  $\mu$ L y 300  $\mu$ L de etanol al 100 %. Se mezclará bien usando vortex.

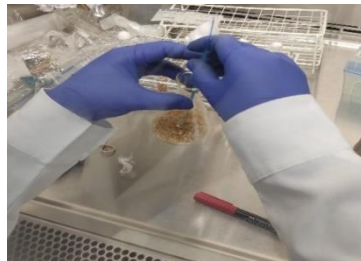
- 12) Se insertará una minicolumna de ADN HiBind® en un tubo de recogida de 2 mL. Toda la muestra se transferirá (incluido cualquier precipitado que se haya formado) a la minicolumna de ADN HiBind® y se centrifugará a 10 000 x g durante 1 minuto.
- 13) Se procederá a desechar el filtrado y el tubo de recolección y se transferirá la minicolumna de ADN HiBind® a un nuevo tubo de recogida de 2 mL.
- 14) Luego se agregará 750 µL de tampón de lavado de ADN y se centrifugará a 10 000 x g durante 1 minuto.
- 15) Se procederá a desechar el filtrado y reutilizará el tubo de recolección.
- 16) Se repetirá los pasos 14 y 15 para un segundo paso de lavado con tampón de lavado de ADN.
- 17) Se centrifugará la minicolumna de ADN HiBind® vacía a velocidad máxima durante 2 minutos para secar la membrana y se transferirá la minicolumna de ADN HiBind® a un tubo de microcentrífuga de 1,5 o 2 mL sin nucleasas.
- 18) Se agregará 100 µL de tampón de elución calentada a 65 °C.
- 19) Se dejará reposar de 3 a 5 minutos. Luego se centrifugará a 10 000 x g durante 1 minuto.
- 20) Se repetirá los pasos 18 a 19 para un segundo paso de elución.
- 21) El ADN se guardará a -20 °C.

### *Anexo 7. Ensayos de fermentación sumergida*

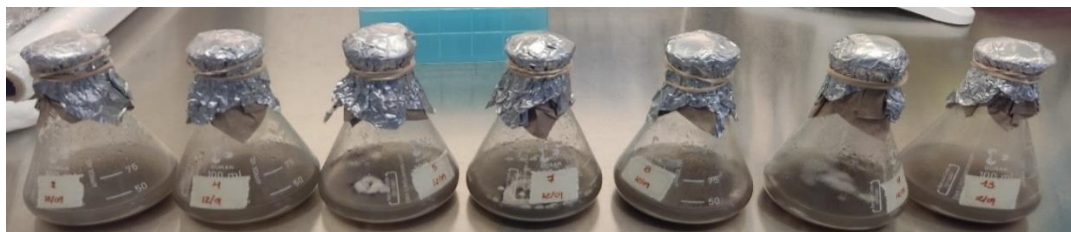
#### Preparación del medio de producción



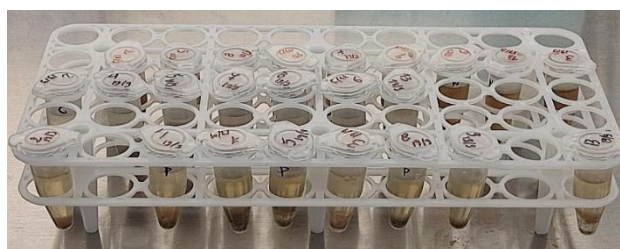
#### Inoculación de hongos en medios de producción



#### Producción al séptimo día



#### Toma de muestra del extracto crudo



*Anexo 8. Recuperación de extractos crudos*

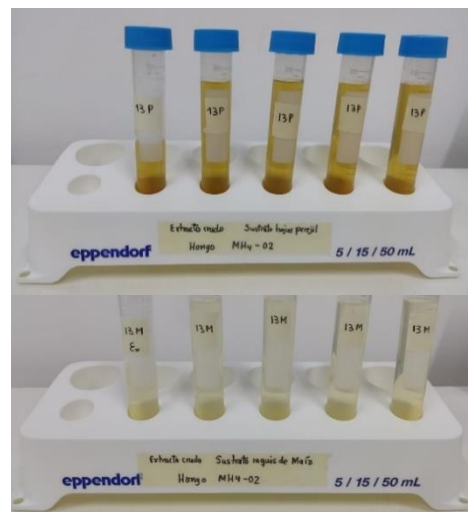
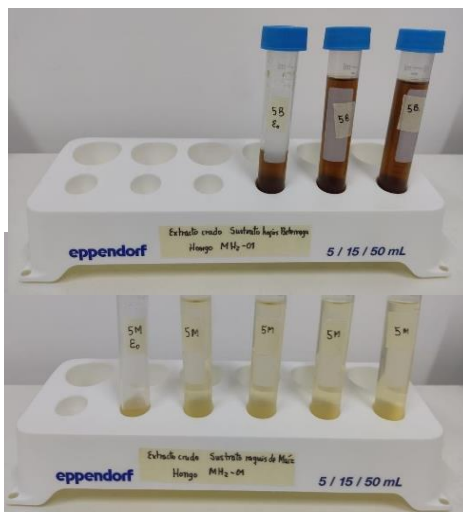
Medio fermentativo cepa FC-5



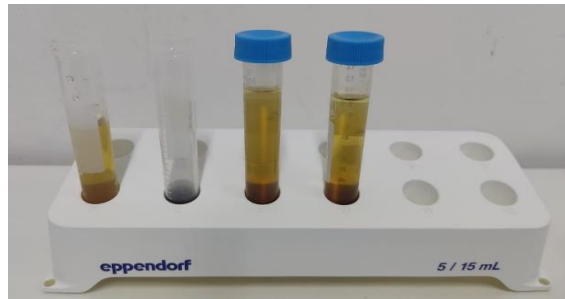
Medio fermentativo cepa FC-13



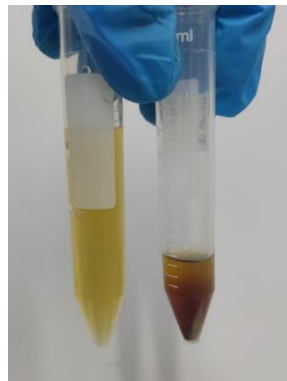
Obtención del extracto crudo empleando diferentes sustratos



### Fraccionamiento por Sulfato de amonio



### Enzima celulasa concentrada



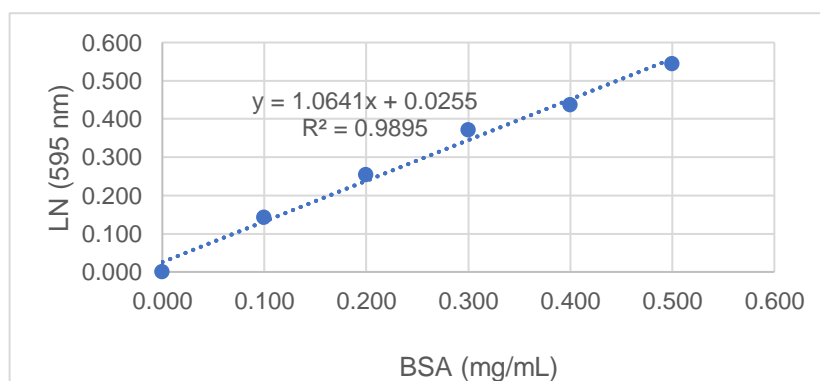
### Anexo 9. Curva de calibración para BSA

#### Curva Patrón

- Se preparó una solución estándar de proteína – Albúmina Sérica Bovina – BSA (1 mg/mL).
- Fue almacenado a temperatura de refrigeración.
- En la microplaca de lectura se realizaron las diluciones por triplicado, para la curva de calibración de acuerdo con lo indicado en la siguiente tabla:

Solución Estándar BSA (μL)	V <sub>H<sub>2</sub>O</sub> (μL)	Bradford (μL)	V <sub>Final</sub> (μL)	Concentración Final (mg/mL)	R1	R2	R3	R4	$\bar{y}$	LN	CV (%)
0	20	200	220	0,0	0,303	0,295	0,291	0,3	0,297	0,000	1,79
2	18	200	220	0,1	0,434	0,451	0,44	0,434	0,440	0,143	1,82
4	16	200	220	0,2	0,545	0,531	0,564	0,564	0,551	0,254	2,92
6	14	200	220	0,3	0,615	0,654	0,708	0,699	0,669	0,372	6,44
8	12	200	220	0,4	0,737	0,717	0,699	0,783	0,734	0,437	4,93
10	10	200	220	0,5	0,823	0,84	0,857	0,848	0,842	0,545	1,72
12	8	200	220	0,6	0,877	0,854	0,864	0,868	0,866	0,569	1,10
14	6	200	220	0,7	0,9	0,915	0,884	0,902	0,900	0,603	1,41
16	4	200	220	0,8	0,956	0,909	0,937	0,915	0,929	0,632	2,32
18	2	200	220	0,9	1,027	0,983	0,61	1,01	0,995	0,698	2,93
20	0	200	220	1,0	1,043	1,019	1,09	0,997	1,037	0,740	3,84

- Se agregó 200 μL del Reactivo de Bradford a cada pocillo utilizando la micropipeta multicanal.
- Se procedió a mezclar suavemente evitando burbujas.
- Se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos.
- La lectura de microplacas se realizó en el lector de microplacas EPOCH 2-Biotek a una longitud de onda de 595 nm.



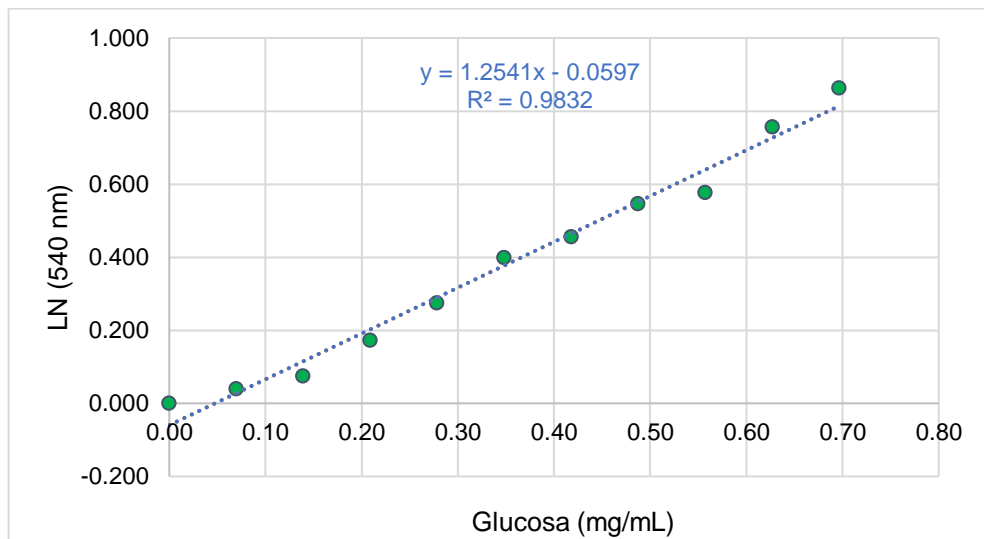
**Figura 28.** Curva de calibración para reactivo Bradford (mg/mL)

*Anexo 10. Curva de calibración para la glucosa*

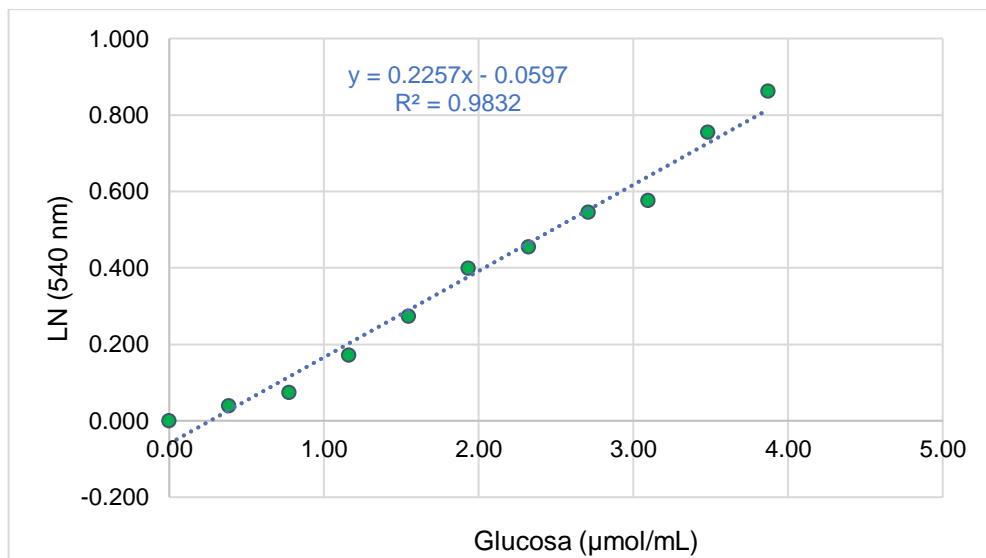
- Se realizó la curva de calibración de la glucosa para un volumen de reacción de 62  $\mu\text{L}$ .
- En la microplaca termorresistente se realizaron las diluciones para la curva de calibración de acuerdo con lo indicado en la siguiente tabla:

Glucosa ( $\mu\text{mol/mL}$ )	Glucosa ( $\text{mg/mL}$ )	Estándar ( $\mu\text{L}$ )	V $\text{H}_2\text{O}$	Tampón ( $\mu\text{L}$ )	DNS ( $\mu\text{L}$ )	V <sub>final</sub> ( $\mu\text{L}$ )	R1	R2	R3	R4	$\bar{y}$	LN	CV
0,000	0,000	0	21	41	100	162	0,002	0,006	0,004	0,004	0,004	0,000	40,82
0,387	0,070	1	20	41	100	162	0,037	0,046	0,048	0,041	0,043	0,039	11,55
0,774	0,139	2	19	41	100	162	0,076	0,067	0,089	0,078	0,078	0,074	11,66
1,161	0,209	3	18	41	100	162	0,117	0,164	0,209	0,214	0,176	0,172	25,74
1,548	0,279	4	17	41	100	162	0,277	0,257	0,270	0,304	0,277	0,273	7,15
1,935	0,348	5	16	41	100	162	0,379	0,392	0,400	0,438	0,402	0,398	6,30
2,323	0,418	6	15	41	100	162	0,411	0,464	0,495	0,464	0,459	0,455	7,61
2,710	0,488	7	14	41	100	162	0,540	0,513	0,583	0,559	0,549	0,545	5,40
3,097	0,557	8	13	41	100	162	0,589	0,581	0,556	0,595	0,580	0,576	2,96
3,484	0,627	9	12	41	100	162	0,729	0,799	0,775	0,733	0,759	0,755	4,46
3,871	0,697	10	11	41	100	162	0,868	0,829	0,900	0,869	0,867	0,863	3,36

- Se agregó 100  $\mu\text{L}$  del reactivo DNS.
- La microplaca se colocó a hervir a 100°C durante 5 minutos.
- Trasvasar 100  $\mu\text{L}$  de la reacción anterior a una microplaca de lectura.
- Se procede a leer la absorbancia a 540 nm en el lector de microplacas EPOCH 2-Biotek.



**Figura 29.** Curva de calibración para glucosa (mg/mL)



**Figura 30.** Curva de calibración para glucosa en ( $\mu\text{mol/mL}$ )

*Anexo 11. Análisis estadísticos*

**Tabla 29**

*Análisis de varianza para el Índice Enzimático*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	7,55859	7	1,0798	232,81	0,0000
Intra grupos	0,0742113	16	0,00463821		
Total	7,6328	23			

**Tabla 30**

*Prueba de Duncan para los promedios de Índice Enzimático*

Hongo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
FC-3	3	0,089	X
FC-4	3	0,124333	X
FC-2	3	0,211	X
FC-8	3	1,11233	X
FC-9	3	1,15133	X
FC-7	3	1,205	X
FC-13	3	1,42233	X
FC-5	3	1,47633	X

**Tabla 31***Análisis de varianza para influencia del pH en el crecimiento*

	G. libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Intercepto	1	1,988240	1,988240	172,7496	0,000000
<i>Tratamientos</i>	2	2,153856	1,076928	93,5697	0,000000
Bloques	4	0,289508	0,072377	6,2885	0,000551
Error	38	0,437356	0,011509		
Total	44	2,880720			

**Tabla 32***Prueba de Duncan para los promedios de biomasa a diferentes pH*

Tratamiento	Casos	Media Biomasa (g)	Grupos homogéneos
pH 10	15	0,012267	a
pH 7	15	0,103220	b
pH 5	15	0,515107	c

**Tabla 33***Análisis de varianza para influencia de la temperatura en el crecimiento*

	G. libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor p
Intercepto	1	149815	149814,6	4,186763	0,044728
<i>Tratamientos</i>	4	592382	148095,5	4,138721	0,004723
Bloques	4	590914	147728,4	4,128462	0,004793
Error	66	2361672	35782,9		
Total	74	3544968			

**Tabla 34***Prueba de Duncan para los promedios de biomasa a diferentes temperaturas*

Tratamiento	Casos	Media Biomasa (g)	Grupos homogéneos
80 °C	15	0,0081	a
70 °C	15	0,1133	a
40 °C	15	0,2801	a
60 °C	15	0,6276	a
50 °C	15	222,4394	b

*Anexo 12. Clave taxonómica utilizada para la identificación de la cepa FC-05*

(Wabusya y Vicent, 2015)

1. Los aislamientos fueron predominantemente biseriados-----  
-----2  
**1. Los aislamientos fueron predominantemente uniseriados-----  
-----10**
2. Las colonias aparecieron en tonos de negro a marrón-----  
-----3  
2. Colonias en tonos de blanco, verde oscuro, marrón oliváceo a ocráceo-----  
-----6
3. Las colonias tenían bordes irregulares en MEA con vesículas pequeñas de menos de 16  $\mu\text{m}$ -----  
-----*A. Heteromorphus*  
3. Colonias con bordes lisos en MEA con vesículas grandes entre 32 - 60  $\mu\text{m}$ -----  
-----4
4. El diámetro de la colonia en CYA25°C después de 7 días fue superior a 63 mm con conidios de gran tamaño, de 7 a 10  $\mu\text{m}$  -----  
-----*A. carbonarius*
4. El diámetro de las colonias en CYA 25°C estuvo entre 45 y 55 mm y el rango de conidios fue de 3 a 6  $\mu\text{m}$ -----5
5. Tenían anillos de esporulación distintivos en PDA con micelio blanco en los bordes en MEA y área de conidiación negra y tiene un estípite estrecho-----  
-----*A. brasiliensis*
5. Las colonias formaron surcos radiales en PDA, tenían un pequeño borde blanco de la colonia en MEA y una gran área negra de conidiación-----  
-----*A. niger*
6. La cabeza del conidio era columnar con fiálides poco compactas que cubrían la mitad de la vesícula, tenía un conidióforo muy corto que se tornó marrón con-----  
-----*A. nidulantes*
6. Las cabezas de los conidios eran globosas a radiadas con fiálides que cubrían la totalidad o tres cuartas partes de la vesícula. -----  
-----7
7. Las cabezas de los conidios eran grandes (60 - 80  $\mu\text{m}$ ) con fiálides y conidios compactos, producían pigmentos solubles de color naranja en CYA, lo que hacía que el reverso tuviera un color naranja intenso y conidios muy pequeños de 2 - 4  $\mu\text{m}$  -----  
-----*A. ocrácea*

7. Las cabezas de los conidios eran pequeñas (64 - 69  $\mu\text{m}$ ) y de estípito largo, los conidios eran compactos con colores blanco, marrón a canela en MEA-----

-----8

8. Mostraron un crecimiento rápido en todos los medios, tenían conidios grandes con textura rugosa de las colonias en CYA y CZ era rugosa con un área de conidiación que parecía de color amarillo yema-----A. tamaritii

8. El crecimiento fue lento en todos los medios-----

-----9

9. Las colonias produjeron pigmentos solubles de color marrón rojizo en CYA-----

-----A. ostianus

9. Se produjeron colonias de color blanco con conidios pequeños de 2 - 3  $\mu\text{m}$  lisos y blancos, se observó presencia de una cabeza de conidio diminuta-----

-----A. candidus

10. La cabeza de Conidia era claviforme-----

-----11

**10. Cabeza de conidios globosa, radiada o columnar-----**

**-----13**

11. Las colonias tenían bordes irregulares en MEA con estípitos muy largos y anchos y conidios elípticos de color gris. -----

-----A. longivesica

11. Las colonias tenían bordes regulares en MEA, con longitud y ancho moderados del estípito y conidios elipsoidales de color gris azulado-----

-----12

12. Las colonias tenían bordes blancos de micelio, con apariencia gris azulada, formaban surcos radiales y anillos de esporulación en MEA, en CZ también formaban anillos de esporulación y tenían dos tipos de cabezas de conidios -----

-----A. clavatus

12. Las colonias eran de color verde oscuro con un borde muy fino de micelio blanco en MEA, tenían células del pie variadas que formaban proyecciones similares a dedos-----

-----A. rhizopodus

13. Las colonias eran de color marrón café en MEA y marrón cacao en CYA, formaban surcos radiales distintivos, tenían cabezas de conidios globosas y elipsoidales con un diámetro de vesícula que oscilaba entre 29 y 45  $\mu\text{m}$ . -----

-----A. japonicus

**13. Las colonias eran de tonos negros y verdes-----**

**-----14**

14. Las colonias eran negras y de color marrón dátil en MEA y mostraron su primer crecimiento en todos los medios con un diámetro de colonia que oscilaba entre 38 y 60 mm, tenían vesículas muy anchas con diámetros de 45 a 74  $\mu\text{m}$  y conidióforos cortos-----

-----15

**14. Las colonias eran de color verde amarillento a verde oscuro con abundante conidiación en la esporulación en todos los medios-----**

**-----16**

15. Tuvieron el primer crecimiento de las colonias en todos los medios y de color marrón café con surcos radiales en CYA y de color marrón cacao en CZ y reverso marrón sucio-----

-----A. aculeatus (A)

15. Demostraron un crecimiento lento en todos los medios, las colonias eran de color amarillo claro en CYA y CZ. Produjeron pigmentos solubles de color amarillo limón en CYA y se formaron surcos radiales tanto en el frente como en el reverso de las colonias. El reverso era de color amarillo intenso-----A. aculeatus (B)

16. Las colonias aparecieron en tonos de verde amarillento a medida que formaban anillos de esporulación con micelios blancos en las colonias MEA en CYA y CZ eran amarillas con conidios lisos a finamente rugosos (3,5 - 5  $\mu\text{m}$ )-----A. flavus

**16. El crecimiento de las colonias se vio restringido en CZ, produjeron esclerocios en CYA y CZ, producidos con conidios rugosos y verdes-----17**

17. Tenían cabezas de conidios radiados-----  
-----18

**17. Tenían cabezas de conidios columnares-----  
-----19**

18. En PDA las colonias eran de color verde oscuro con anillos de esporulación distintivos, algunas tenían cabezas de conidios abultados, con vesículas piriformes a globosas -----  
-----A. parasiticus (A)

18. Las colonias tenían anillos de esporulación alternos distintivos en PDA, las cabezas de los conidios estaban erguidas al final del estípote y la vesícula era radiada a globosa-----  
-----A. parasiticus (B)

**19. Produjeron pigmentos solubles en CYA, tenían cabezas de conidios cortos, vesículas piriformes a subclavias a claviformes, estípote de paredes gruesas -----  
-----20**

19. Faltaban pigmentos solubles en CYA-----  
-----21

20. La vesícula era piriforme a subclavia con un estípote de paredes gruesas y conidios pequeños entre 2 - 3,5  $\mu\text{m}$ -----  
----- A. duricaulis

**20. La vesícula era espatulada a claviforme, con conidióforos muy cortos y el estípote se expandía hacia la punta al unirse a la vesícula-----  
-----A. fumigatus**

21. Tienen formas variadas de las vesículas y la fijación de las fiálides sobre la vesícula-----  
-----22

21. Tenía conidios grandes de 4 a 7  $\mu\text{m}$  con cuello variado en el estípote, algunos estípotes se expandieron hacia la vesícula, otros mantuvieron el mismo ancho, vesícula grande de 21 a 29  $\mu\text{m}$ , fiálides unidas de forma laxa a la vesícula -----  
-----A. novofumigatus (A)

22. Tenía conidios pequeños de 3 a 5  $\mu\text{m}$ , vesículas pequeñas de 11 a 21  $\mu\text{m}$ , fiálides compactas y que cubrían casi la mitad de la vesícula-----  
-----A. novofumigatus (B)